

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 640**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/564** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2009 E 09790621 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2313778**

54 Título: **Diagnósticos para nefropatía membranosa**

30 Prioridad:

**18.07.2008 US 81786 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.05.2015**

73 Titular/es:

**BOSTON MEDICAL CENTER CORPORATION  
(50.0%)  
One Boston Medical Center Place  
Boston, MA 02118, US y  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SALANT, DAVID, J.;  
BECK, LAURENCE, H. y  
LAMBEAU, GERARD**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 535 640 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## Descripción

## Diagnósticos para nefropatía membranosa

## 5 Antecedentes de la invención

El síndrome nefrótico, que se caracteriza por edema y grandes cantidades de proteína en la orina, es un trastorno relativamente común del riñón que tiene muchas causas posibles, incluyendo la nefropatía membranosa (MN), glomeruloesclerosis focal y segmentaria, enfermedad de cambios mínimos, nefropatía diabética, glomerulonefritis membranoproliferativa, así como otras causas. Aunque existen tratamientos no-específicos que mejoran algunos de los signos y síntomas de la afección nefrótica, el conocimiento específico de la enfermedad subyacente es generalmente necesario para guiar el tratamiento definitivo. Cuando un paciente con el síndrome nefrótico se evalúa inicialmente en forma ambulatoria o en el hospital, se indica generalmente por el médico un panel de pruebas de sangre para buscar causas potenciales que son detectables por serología (por ejemplo, la presencia de anticuerpos antinucleares (ANA) y/o anticuerpos anti-ADN bicatenario en el contexto de los hallazgos típicos en el sedimento pueden sugerir nefritis por lupus). En la actualidad no hay una prueba serológica para identificar MN, y el diagnóstico se basa exclusivamente en la biopsia renal, un procedimiento invasivo que requiere hospitalización durante la noche en muchas instituciones y que puede ser complicado por gran sangrado interno. MN puede estar causada por una serie de factores secundarios, tales como el lupus eritematoso sistémico, hepatitis B, o sífilis, y las pruebas de sangre son rutinariamente enviadas a buscar estas causas (ANA, antígenos anti-hepatitis B, reagina plasmática rápida (RPR), respectivamente). Sin embargo, en los Estados Unidos, MN es más frecuentemente primario o idiopático, en su origen y como se mencionó anteriormente, ninguna prueba de sangre para esta forma existe en la actualidad. Por lo tanto, hay una necesidad de identificar la causa subyacente de MN y desarrollar una prueba simple, no invasiva para diagnosticar MN y seguir la respuesta al tratamiento.

25

## Breve descripción de la invención

Las modalidades de la invención se basan en el descubrimiento de que la causa subyacente de la nefropatía membranosa (MN) idiopática es la presencia de auto-anticuerpos contra el receptor de fosfolipasa A2 tipo M (PLA2R) que se expresa en los glomérulos del riñón. Los auto-anticuerpos son predominantemente de la subclase IgG4. Además, los auto-anticuerpos anti-PLA2R de las subclases IgG1, IgG2, e IgG3 estuvieron presentes también. Los sueros de individuos que tienen MN idiopática tienen cantidades detectables de dichos auto-anticuerpos. Saber que la presencia de auto-anticuerpos se asocia con MN y que PLA2R es el objetivo de estos auto-anticuerpos ha permitido el desarrollo de un inmunoensayo serológico simple para el diagnóstico de MN idiopática. Esta detección de auto-anticuerpos anti-PLA2R proporciona un método rápido, preciso y rentable, seguro y no invasivo de diagnóstico de MN idiopática, en comparación con el método actual de una biopsia de tejido renal.

35

Como consecuencia, en una modalidad, se proporciona en la presente descripción un método para diagnosticar MN en un sujeto, el método que comprende detectar la presencia de anticuerpos que son reactivos a una PLA2R, en donde los anticuerpos se encuentran en una muestra obtenida de un sujeto. Los anticuerpos se pueden detectar mediante un inmunoensayo en el que se forma un complejo anticuerpo-proteína. Los anticuerpos se encuentran en la muestra del sujeto, por ejemplo suero. El sujeto es un humano y la MN es idiopática. Antes del método de diagnóstico, no se realiza una biopsia del riñón. Los individuos sanos tienen auto-anticuerpos anti-PLA2R mínimos o indetectables por ELISA convencional o inmunoelectrotransferencia. Los individuos con MN idiopática tienen cantidad significativa de auto-anticuerpos anti-PLA2R detectables, al menos 10% más de auto-anticuerpos anti-PLA2R detectados por encima de los un individuo no-MN sano o el nivel obtenido para una población de individuos no-MN saludables por ELISA convencional o inmunoelectrotransferencia como se describe en la presente. Por otra parte los niveles de autoanticuerpos se corresponden con las características clínicas de la condición de la enfermedad por ejemplo, proteinuria y síndrome nefrótico. Los pacientes en remisión después del tratamiento eficaz tienen auto-anticuerpos anti-PLA2R mínimos o indetectables por ELISA convencional o inmunoelectrotransferencia. Como un ejemplo, se entiende por cantidad indetectable de auto-anticuerpos anti-PLA2R, que no se observe banda visible en un análisis de inmunoelectrotransferencia realizado como se describe en el Ejemplo 1, en donde el suero humano se diluye 1:100 y se usa en los ensayos de transferencia descritos en la presente. En una modalidad, la cantidad de auto-anticuerpos anti-PLA2R en un individuo sano no-MN o la cantidad promedio en una población de individuos sanos no-MN como se determina por ELISA convencional o inmunoelectrotransferencia que se expone en el Ejemplo 1 se puede considerar como el nivel de referencia anterior o el de control. Las muestras de suero recogidas a partir de los individuos sanos no-MN se diluyen 1: 100 y se usan en ensayos de inmunoelectrotransferencia. La intensidad de la banda visible se cuantifica por densitometría. La intensidad de la densitometría se puede calibrar con un intervalo de título conocido de anti anticuerpos PLA2R que reaccionan con una cantidad fija de antígeno PLA2R. Por ejemplo, el intervalo de título de anticuerpo conocido puede ser 0 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1.0 µg/ml, 1.5 µg/ml, 2.0 µg/ml, 2.5 µg/ml, 3.0 µg/ml, 5 µg/ml, 7.5 µg/ml, 10 µg/ml, y 15 µg/ml y la cantidad fijada de PLA2R puede ser 0.5 µg en una membrana de transferencia. Comparando la intensidad de densitometría de una muestra humana con la curva de calibración, es posible estimar el título del anti-PLA2R en la muestra. Para los datos recogidos de una población de individuos, se calcula el valor

60

- 5 promedio y un orden de la desviación estándar. Idealmente, una población tiene aproximadamente 25 individuos sanos no-MN, preferentemente más. Las estadísticas, el valor promedio y un orden de la desviación estándar se pueden cargar en el sistema informático y medio de almacenamiento de datos. Los pacientes que tienen al menos 10% más que esta cantidad promedio de los auto-anticuerpos anti-PLA2R es probable que tenga MN, especialmente si el paciente también presenta las características significativas clínicas de la enfermedad, por ejemplo proteinuria y síndrome nefrótico.
- 10 En una modalidad, los auto-anticuerpos en la muestra son reactivos contra el PLA2R que se extrajo de los tejidos de mamíferos o PLA2R de mamífero recombinante, por ejemplo el PLA2R humana o porcina. La muestra del sujeto puede ser una muestra de sangre. En otras modalidades, la muestra es una muestra de suero o plasma.
- 15 En una modalidad, los auto-anticuerpos se detectan mediante un inmunoensayo serológico, tal como un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas o un inmunoensayo nefelométrico.
- 20 En una modalidad, el método incluye una evaluación pronóstico de un sujeto que se trata por nefropatía membranosa, el método que comprende: (a) medir un nivel de anticuerpos que son reactivos a una PLA2R en al menos dos muestras biológicas obtenidas de un sujeto paciente a diferentes tiempos, en donde los diferentes tiempos son un primer punto de tiempo y un segundo punto de tiempo, en donde el segundo punto de tiempo es después del primer punto de tiempo, y en donde el paciente se somete a tratamiento para MN; y (b) comparar los niveles de los anticuerpos en al menos dos muestras biológicas, en donde una disminución en el nivel de anticuerpos tomado en el segundo punto de tiempo en comparación con el primer punto de tiempo indica que el tratamiento es eficaz, en donde un aumento en el nivel de los anticuerpos tomados en el segundo punto de tiempo en comparación con el primer punto de tiempo indica que el tratamiento no es eficaz, y en donde cuando el nivel de anticuerpos en el segundo punto de tiempo disminuye por debajo del límite de detección del inmunoensayo, indica que hay remisión. La disminución es al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, 100% y todos los porcentajes entre 10-100%. El nivel de los anticuerpos puede ser detectado mediante un inmunoensayo en donde se forma un complejo anticuerpo-proteína y se detecta el complejo. Los anticuerpos se encuentran en la muestra del sujeto, por ejemplo suero. En una modalidad, el tratamiento es un tratamiento inmunosupresivo. En una modalidad, el nivel de anticuerpos en un punto de tiempo más tarde, por ejemplo el segundo punto de tiempo, es entre 95-100% o inferior comparado con el primer punto de tiempo, que se considera por debajo del límite de detección del inmunoensayo, entonces el sujeto está en remisión de la MN. En una modalidad, por debajo del límite de detección de una inmunoelectrotransferencia es cuando no está presente ninguna banda visible cuando se realiza el ensayo de acuerdo con el método que se expone en el Ejemplo 1.
- 30
- 35 También se prevé un método de evaluación pronóstico en un sujeto para nefropatía membranosa, el método que comprende: (a) determinar en un primer punto de tiempo un nivel de anticuerpos que son reactivos a una PLA2R en donde los anticuerpos se encuentran en una muestra de un sujeto; y (b) determinar en al menos un segundo punto de tiempo un nivel de anticuerpos que son reactivos a una PLA2R, en donde el segundo punto de tiempo es después de primer punto de tiempo; en donde cuando el nivel de anticuerpos en el segundo punto de tiempo disminuye por debajo del límite de detección indica que hay remisión espontánea. La disminución es de al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, 100% y todos los porcentajes entre 10-100%. Como se discutió en este documento, tales disminuciones indican que el paciente está mejorando con respecto a la lectura anterior. Por debajo del límite de detección es cuando el nivel de anticuerpos se reduce entre 95-100% y sin que se compare con el primer punto de tiempo. En una modalidad, por debajo del límite de detección de una inmunoelectrotransferencia es cuando no se observa ninguna banda visible cuando se realiza el ensayo de acuerdo con el método que se expone en el Ejemplo 1.
- 40
- 45
- 50 En una modalidad, cuando el sujeto que se trata para MN y el nivel de anticuerpos en el segundo punto de tiempo está por debajo del límite de detección del inmunoensayo, entonces se considera que el sujeto está en remisión para MN.
- 55 También se prevé un método de evaluación pronóstico en un sujeto para nefropatía membranosa, el método que comprende: (a) determinar en un primer punto de tiempo un nivel de anticuerpos que son reactivos a una PLA2R, en donde los anticuerpos se encuentran en una muestra de un sujeto; y (b) determinar en al menos un segundo punto de tiempo un nivel de anticuerpos que son reactivos a una PLA2R, en donde el segundo punto de tiempo es después de primer punto de tiempo, y c) comparar los niveles de anticuerpos de los puntos de tiempo primero y segundo, en donde un aumento en el nivel de anticuerpos en el último punto de tiempo en comparación con el primer punto de tiempo indica que hay una recaída de nefropatía membranosa. El incremento es al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, 50%, al menos 100%, al menos 200%, al menos 300%, al menos 500%, al menos 1000%, o más e incluye todos los porcentajes entre 10-1000%.
- 60 Se describe un método de tratamiento de la nefropatía membranosa en un sujeto, el método comprende eliminar un anticuerpo que es reactivo a una PLA2R en una muestra de un sujeto. Los anticuerpos se eliminan de la sangre por inmunoabsorción. La muestra se regresa nuevamente en el sujeto después de la eliminación de los anticuerpos.

- 5 En una modalidad, se proporciona en la presente descripción PLA2R o fragmentos antigénicos de la misma o un vector que expresa una PLA2R o fragmentos antigénicos de la misma para uso en el tratamiento de MN en un sujeto, incluyendo MN idiopática.
- 10 En una modalidad, se proporciona en la presente descripción una composición para uso en el tratamiento de la nefropatía membranosa idiopática, la composición que comprende PLA2R o fragmentos antigénicos de la misma.
- 15 En otra modalidad, se proporciona en la presente descripción un uso de una cantidad eficaz de PLA2R o fragmentos antigénicos de la misma o un vector que expresa una PLA2R o fragmentos antigénicos de la misma en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la nefropatía membranosa en un sujeto.
- 20 En una modalidad, los fragmentos adecuados para el tratamiento u adsorción son fragmentos que comprenden los CTLD o CRD 4, 5 6 del PLA2R.
- 25 En una modalidad, se proporciona en la presente descripción un inmunoensayo que comprende: poner en contacto una muestra de un sujeto con una PLA2R o fragmento antigénico PLA2R de la misma; formar un complejo anticuerpo-proteína entre el anticuerpo presente en una muestra con el PLA2R o fragmento antigénico PLA2R de la misma; lavar para eliminar cualquier anticuerpo no unido; añadir un anticuerpo de detección que está marcado y es reactivo con el anticuerpo de la muestra; lavar para eliminar cualquier anticuerpo de detección marcado no unido; y convertir la etiqueta en una señal detectable, en donde la presencia de una señal detectable indica la probabilidad de MN, incluyendo MN idiopática, en el sujeto.
- 30 En una modalidad, la MN es idiopática. En otras modalidades, el sujeto es un humano, y la muestra es una muestra de sangre. En otra modalidad, no se realiza en el sujeto una biopsia del riñón.
- 35 En una modalidad, el PLA2R es una PLA2R de mamífero, una proteína PLA2R humana o porcina. En una modalidad, el PLA2R o fragmento de proteína PLA2R del mismo se deposita o inmoviliza sobre un soporte sólido. En otra modalidad, una cantidad conocida de una PLA2R o fragmento de proteína PLA2R se deposita o acopla a un soporte sólido. En otras modalidades, el soporte puede estar en el formato de una varilla graduada, una tira de prueba, una gota de látex, una microesfera o una placa de múltiples pocillos.
- 40 En una modalidad, los auto-anticuerpos anti-PLA2R son de la subclase: IgG1-4. En una modalidad, el anticuerpo de detección está marcado mediante el enlace covalente a una enzima, marcado con un compuesto fluorescente o metal, o marcado con un compuesto quimioluminiscente. En otra modalidad, el anticuerpo de detección es específicamente reactivo con el sujeto, por ejemplo, si el sujeto es un humano, el anticuerpo de detección es específico de humano.
- 45 En una modalidad, la señal detectable se compara con un conjunto de señales detectables de una curva de titulación derivada de inmunoensayos de cantidades conocidas de PLA2R o fragmentos en cantidad creciente.
- 50 Se prevé que el inmunoensayo puede realizarse para una pluralidad de muestras de un sujeto obtenida en un periodo de tiempo. La pluralidad de muestras se obtiene cada dos o tres meses durante al menos un período de dos años. La señal detectable o intensidad de dispersión de la luz de cada inmunoensayo se compara con la señal o la intensidad de dispersión de luz detectable de las muestras obtenidas a partir de un punto de tiempo previo, en donde una reducción de al menos 5% de la señal de detección o intensidad de dispersión de la luz indica el tratamiento eficaz de MN en el sujeto. La disminución es de al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, 100% y todos los porcentajes entre 10-100%.
- 55 En la presente se describe además un dispositivo para identificar la presencia o el nivel de anticuerpos que son reactivos a una PLA2R en una muestra de un sujeto que comprende: al menos una proteína PLA2R o fragmentos de la misma; y al menos un soporte sólido en donde la proteína PLA2R o fragmentos de la misma se deposita sobre el soporte. La proteína PLA2R o fragmentos de la misma se deposita sobre el soporte sólido, se inmoviliza sobre el soporte, y el soporte sólido está en el formato de una varilla graduada, una tira de prueba, una gota de látex, una microesfera o una placa de múltiples pocillos.
- 60 En la presente se describe además el uso de los dispositivos descritos en la presente para facilitar el diagnóstico de MN en un sujeto, en donde una cantidad detectable de anticuerpos que son reactivos a una PLA2R indica la probabilidad de nefropatía membranosa en el sujeto.
- En la presente se describen además estuches que comprenden dispositivos descritos en la presente invención. Los estuches comprenden además un anticuerpo de detección, en donde el anticuerpo de detección es específico para los anticuerpos que son reactivos a una PLA2R en la muestra del sujeto y produce una señal detectable; una segunda proteína PLA2R marcada o fragmentos de la misma que produce una señal detectable; y/o una cubeta de nefelómetro.

Se prevé y describe además un sistema que comprende: un módulo de medición que mide la información de auto-anticuerpo que comprende una señal detectable de un inmunoensayo que indica la presencia o el nivel de anticuerpos que son reactivos a una PLA2R a partir de una muestra obtenida de un sujeto; un módulo de almacenamiento configurado para la salida de datos almacenados desde el módulo de medición; un módulo de comparación adaptado para comparar los datos almacenados en el módulo de almacenamiento con datos de referencia y/o control, y para proporcionar un contenido recuperado, y un módulo de salida para la visualización del contenido recuperado por el usuario, en donde la presencia de una cantidad detectable de anticuerpos reactivos contra PLA2R en el contenido recuperado indica que el sujeto tiene MN o tiene una recaída de MN.

Se prevé además en la presente descripción un sistema para facilitar la evaluación pronóstico de la nefropatía membranosa (MN) en un sujeto, que comprende: un módulo de determinación configurado para recibir y sacar información de auto-anticuerpo de una PLA2R a partir de una muestra obtenida de un sujeto, en donde la información de auto-anticuerpos mide el nivel de auto-anticuerpos que son reactivos a la PLA2R; un módulo de almacenamiento configurado para almacenar información de salida desde el módulo de determinación; un módulo de comparación adaptado para comparar los datos almacenados en el módulo de almacenamiento con datos de referencia y/o datos de control, y para proporcionar un contenido de comparación, y un módulo de salida para la visualización del contenido de comparación para el usuario, en donde si no hay cantidad detectable de auto anticuerpos reactivos contra PLA2R entonces el sujeto está en remisión o si hay una reducción de al menos 10% a una lectura previa, entonces el tratamiento de MN es eficaz en el sujeto. La reducción es al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, 100% y todos los porcentajes entre 10-100%. Los datos de referencia o de control pueden comprender los datos anteriores del mismo sujeto en donde los datos anteriores indicaron cantidades detectables de auto-anticuerpos, detectable por cualquier ELISA convencional o inmunoensayos nefelométricos descritos en la presente y los conocidos en la técnica. Los datos de referencia o de control puede comprender el valor promedio de auto-anticuerpos anti-PLA2R y una orden de la desviación estándar que se obtiene de una población de pacientes con MN idiopáticas. Los sueros recogidos a partir de estos individuos con MN idiopáticas se diluyen 1:100 y se usan en los ensayos de inmunoelectrotransferencia. La intensidad de la banda visible se cuantifica por densitometría y se calcula el valor promedio y un orden de la desviación estándar. Idealmente, una población tiene aproximadamente 25 individuos con MN idiopáticas, preferentemente más. Las estadísticas, el valor promedio y un orden de la desviación estándar se pueden cargar en el sistema informático y medio de almacenamiento de datos.

En la presente se describe además un medio de almacenamiento legible computarizado que comprende: un módulo de almacenamiento de datos que contiene datos de una muestra obtenida de un sujeto que representa un nivel de señal de un inmunoensayo para anticuerpos que son reactivos a una PLA2R; un módulo de comparación que compara los datos almacenados en el módulo de almacenamiento de datos con unos datos de referencia y/o datos de control, y para proporcionar un contenido de comparación, y un módulo de salida que muestra el contenido de comparación para el usuario, en donde la presencia de una cantidad detectable de anticuerpos reactivos contra PLA2R de al menos 10% en relación con los datos de referencia y/o datos de control indica que el sujeto tiene MN o tiene una recaída de MN. La cantidad detectable es al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, 100%, 200%, 300% o 1000%, que incluyen todos los porcentajes entre 10-1000%.

Los datos de control pueden comprender datos de una población de individuos sanos no-MN, que es la señal de detección obtenida usando suero humano en la dilución 1: 100 con PBS 1X que inmuno-reacciona con 0.5 µg de PLA2R nativa, en donde el anticuerpo anti-IgG humano con peroxidasa de rábano picante es el anticuerpo con marcaje aparente y la señal de detección es la quimioluminiscencia.

Breve descripción de las figuras

Figura 1A , muestra el suero a partir de pacientes con nefropatía membranosa idiopática (MN) que reconoce específicamente un antígeno glomerular de 200 kDa mediante inmunoelectrotransferencia. El panel (parte superior) muestra las proteínas glomerulares humanas transferidas con cinco sueros diferentes de pacientes con MN idiopática (carriles MN1-5) o con cinco sueros de pacientes con otras afecciones proteinúricas (DN, nefropatía diabética; FS, glomeruloesclerosis focal y segmentaria).

Figura 1B muestra una representación gráfica de la especificidad de la reactividad de varios sueros con el antígeno de 200 kDa. 57% de los sueros de pacientes con MN idiopática reacciona con el antígeno glomerular, mientras que no existen sueros reactivos de 8 pacientes con MN secundaria, 19 controles de la enfermedad (otras afecciones nefróticas o enfermedades autoinmunes), o 23 controles normales.

Figura 1C muestra una representación gráfica de la especificidad de la reactividad de varios sueros con el antígeno (185 kDa) de 200 kDa. 72-82% de los sueros de pacientes con MN idiopática de diferentes regiones reacciona con el

antígeno glomerular, mientras que no existen sueros reactivos de 12 pacientes con MN secundaria, 25 controles de la enfermedad (otras afecciones nefróticas o enfermedades autoinmunes), o 32 controles normales.

5 Figura 2A muestra que el antígeno de 200 kDa en los glomérulos humanos es el receptor de la fosfolipasa A2 tipo M (PLA2R). Las proteínas glomerulares humanas y PLA2R recombinante tratadas con o sin PNGasa F e inmunoelectrotransferencia, se muestran ya sea con el suero MN reactivo o un anticuerpo policlonal producido contra PLA2R.

10 Figura 2B demuestra que los sueros MN humano pueden inmunoprecipitar (IP) PLA2R. Tres sueros reactivos y tres no-reactivos de pacientes MN, así como tres sueros control, se usaron para IP el antígeno objetivo a partir de una mezcla de proteínas glomerulares humanas. Los inmunoprecipitados se transfirieron después a membranas con anticuerpos para PLA2R (parte superior), así como para IgG humana total (panel inferior).

15 Figura 2C muestra que la glicoproteína glomerular identificada por sueros MN reactivos es la PLA2R humana. El suero humano entero para inmunoprecipitar (IP) las proteínas glomerulares, y los IP se sometieron después a electroforesis e inmunoelectrotransferencia con un anticuerpo específico a la PLA2R tipo-M. Los primeros cinco carriles muestran los IP con sueros que se supieron eran positivos por WB (como en la Figura 1). El 6to carril representa un IP con suero de un paciente con MN que se supo que era negativo. Los carriles 7 y 8 muestran los IP con suero de voluntarios normales, y en el carril de final, el suero humano se omitió del IP para descartar la unión no específica de las proteínas glomerulares a las perlas de agarosa.

20

Figura 3A muestra el epítipo en PLA2R que es sensible a la reducción e induce una respuesta predominante de IgG4.

25 Figura 3B y 3C muestra la especificidad de la subclase de IgG de los auto-anticuerpos reactivos a PLA2R.

Figura 4A muestra que sólo IgG eluida de las muestras MN identificó la PLA2R nativa y recombinante.

30 Figura 4B muestra que la IgG eluida de la muestra de biopsia MN3 reconoció sólo las bandas correspondientes a PLA2R

35 Figura 5A muestra que la presencia del anticuerpo anti-PLA2R en el suero del paciente se correlaciona con la actividad de la enfermedad. Sueros en serie se obtuvieron de un único paciente con MN que entró en remisión. El gráfico en la parte superior muestra una disminución en los niveles de proteína urinaria (diamantes) y un aumento de la albúmina sérica (círculos).

40 Figura 5B muestra la inmunoelectrotransferencia en el panel de la parte superior mostrando que la reactividad a la PLA2R nativa y desglicosilada de 200 y 150 kDa está presente sólo en la muestra inicial del mismo paciente de la Figura 5A. La igualdad de carga se muestra mediante la detección de una banda de 98 kDa no-específica. La IgG total en las muestras de suero se muestra en el panel inferior, demostrando un ligero aumento de IgG ya que el paciente entró en remisión de MN.

45 Figura 6A muestra que la reactividad de los sueros a PLA2R se corresponde con la actividad de la enfermedad en el paciente A con MN idiopática. El gráfico muestra la disminución de la proteína en la orina después del tratamiento y la desaparición concomitante de anticuerpos anti-PLA2 en la inmunoelectrotransferencia después del comienzo del tratamiento.

50 Figura 6B muestra que la reactividad de los sueros a PLA2R se corresponde con la actividad de la enfermedad en el paciente A con MN idiopática. El gráfico muestra la correlación de disminución de la proteína en la orina y la desaparición de los anticuerpos anti-PLA2 en la inmunoelectrotransferencia antes y después del comienzo del tratamiento.

Figura 7 muestra los diagramas esquemáticos mostrando el ELISA sándwich inverso (RS-ELISA) y ELISA indirecto.

55 Figura 8A (vista superior) y 8B (vista lateral) muestra los diagramas esquemáticos de una tira de prueba para determinar la presencia y/o nivel de auto-anticuerpos reactivos contra PLA2R en una muestra de fluido.

Figura 9 muestra un diagrama esquemático que muestra la interpretación de los resultados obtenidos usando la tira de prueba mostrada en la Fig. 8.

60 Figura 10 muestra un diagrama esquemático de un ensayo de placa ELISA que comprende las curvas estándar de PLA2R.

Figura 11 muestra un diagrama esquemático de un ensayo de placa ELISA modificado utilizando cantidades fijas de la proteína PLA2R estándar.

Figura 12 es un diagrama en bloque que muestra un sistema ilustrativo para el diagnóstico de MN.

Figura 13 es un conjunto ilustrativo de instrucciones en un medio de almacenamiento legible por informática para su uso con los sistemas descritos en la presente descripción.

#### Descripción detallada de la invención

A menos que se explique de cualquier otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el conocido comúnmente por el experto en la técnica a la que pertenece esta descripción. Las definiciones de términos comunes en las enfermedades renales, la nefrología y la biología molecular se pueden encontrar en The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 18va. Edición, publicado por Merck Research Laboratories, 2006 (ISBN 0-911910-18-2); Robert S. Porter y otros (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8); The ELISA guidebook (Methods in molecular biology 149) de Crowther J. R. (2000); Fundamentals of RIA and Other Ligand Assays by Jeffrey Travis, 1979, Scientific Newsletters; Immunology by Werner Luttmann, publicado por Elsevier, 2006. Las definiciones de términos comunes en la biología molecular se encuentran en Benjamin Lewin, Genes IX, publicado por Jones & Bartlett Publishing, 2007 (ISBN-13: 9780763740634); Kendrew y otros (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

A menos que se indique lo contrario, se llevó a cabo la presente invención utilizando procedimientos estándar, como se describe, por ejemplo, en Maniatis y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, Estados Unidos (1982); Sambrook y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2 ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, Estados Unidos (1989); Davis y otros, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., Nueva York Estados Unidos (1986); o Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol.152, S. L. Berger y A. R. Kimmmerl Eds., Academic Press Inc., San Diego, Estados Unidos (1987), Current Protocols in Molecular Biology (CPMB) (Fred M. Ausubel, y otros, ed., John Wiley and Sons, Inc.), Current Protocols in Protein Science (CPPS) (John E. Coligan, y otros, ed., John Wiley and Sons, Inc.), Current Protocols in Cell Biology (CPCB) (Juan S. Bonifacino y otros, ed., John Wiley and Sons, Inc.), Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique by R. Ian Freshney, Publisher: Wiley-Liss, 5ta edición (2005), Animal Cell Culture Methods (Methods in Cell Biology, Vol 57, Jennie P. Mather y David Barnes editores, Academic Press, 1ra edición, 1998).

Debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, protocolos y reactivos particulares, etc., descritos en la presente y como tal pueden variar. La terminología utilizada en la presente descripción es sólo con el propósito de describir modalidades particulares.

A diferencia de los ejemplos operativos, o donde se indique de cualquier otra forma, debe entenderse que todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción usados en la presente descripción se modifican en todos los ejemplos por el término "aproximadamente." El término "aproximadamente" cuando se usa en conexión con porcentajes puede significar  $\pm 1\%$ .

Los términos singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto lo indique claramente de cualquier otra forma. Similarmente, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto lo indique claramente de cualquier otra forma. Además, debe entenderse que todos los tamaños de base o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, dadas para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados y se proporcionan para la descripción. Aunque método y materiales similares o equivalente a los descritos en la presente descripción pueden usarse en la práctica o ensayo de la descripción, los métodos y materiales adecuados se describen más abajo. La abreviatura, "p. ej.," se deriva del latín por ejemplo, y se usa en la presente descripción para indicar un ejemplo no-limitante. Por lo tanto, la abreviatura "p. ej." es sinónimo del término "por ejemplo."

Todas las patentes y otras publicaciones identificadas tienen el propósito de describir y divulgar, por ejemplo, las metodologías descritas en dichas publicaciones que se pueden usar en conexión con la presente invención. Estas publicaciones se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Todas las declaraciones en cuanto a fecha o representación de los contenidos de estos documentos se basa en la información disponible de los solicitantes y no constituyen admisión alguna sobre la exactitud de las fechas o contenidos de estos documentos.

#### Definición de términos

- 5 El término "fragmento" se refiere a cualquier polipéptido sujeto que tiene una secuencia de residuos de aminoácidos más corta que la de un polipéptido cuya secuencia de residuos de aminoácidos se describe en la presente invención. Un fragmento de PLA2R es una proteína PLA2R truncada o recortada. El polipéptido puede tener truncamientos N-terminal o C-terminal y/o deleciones internas también. Ejemplos de fragmentos son fragmentos que comprenden los CTLD o CRD 4, 5, 6 de PLA2R. En una modalidad, el fragmento incluye el dominio externo de PLA2R, que es los residuos de aminoácidos 1-1392 de la PLA2R humana (sec. con núm. de ident. 2 ). Porciones más cortas de 1-1392 se consideran fragmentos.
- 10 Como se usa en la presente, el término "composición farmacéutica" se refiere a que el agente activo en conjunto con un portador farmacéuticamente aceptable de productos químicos y compuestos usados comúnmente en la industria farmacéutica. El término "portadores farmacéuticamente aceptables" excluye medio de cultivo tisular.
- 15 Como se usa en la presente, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de agente activo que puede reducir la cantidad de auto-anticuerpos solubles disponibles para la unión a PLA2R.
- 20 Como se usa en la presente, el término "tratar" o "tratamiento" se refiere a reducir o aliviar al menos un efecto adverso o síntoma asociado con afecciones médicas que se asocian con la nefropatía membranosa. Estos incluyen reducir la cantidad de auto-anticuerpos contra la proteína PLA2R , reducir, inhibir o detener la producción de auto-anticuerpos contra PLA2R, la supresión del sistema inmune, y reducir la inflamación y la degradación/daño asociado con las actividades de los auto-anticuerpos cuando se unen a los glomérulos renales.
- 25 El término "sujeto" como se usa en la presente descripción incluye, sin limitarse a, un humano, ratón, rata, conejillo de indias, perro, gato, caballo, vaca, cerdo, mono, chimpancé, babuino, o macaco de la india. En una modalidad, el sujeto es un mamífero. En otra modalidad, el sujeto es un humano.
- 30 Tal como se usa en la presente, el término "que comprende" significa que otros elementos pueden también estar presentes adicionalmente de los elementos definidos presentados. El uso de "que comprende" indica inclusión en lugar de limitación.
- 35 Tal como se usa en la presente, el término "MN idiopática" se usa actualmente para describir la MN que no es causada por cualquier etiología secundaria conocida tales como la hepatitis B o lupus previo al presente descubrimiento. Sobre la base del presente descubrimiento, "MN idiopática" se refiere a la MN asociada a PLA2R o cualquier otra designación futura para lo que ahora se denomina MN idiopática y se asocia a anticuerpos anti-PLA2R.
- 40 El término lectina tipo C ("CTLD") o el dominio de reconocimiento de carbohidratos ("CRD") se usan indistintamente en relación a los dominios en PLA2R .
- 45 Las modalidades de la invención se basan en el descubrimiento de que los sueros de los pacientes con MN contienen anticuerpos que son reactivos contra la PLA2R de tipo M que se encuentra en el glomérulo. Nefropatía membranosa idiopática (MN) se considera que es una enfermedad autoinmunitaria específica del glomérulo, sin embargo, el antígeno objetivo principal ha permanecido evasivo. Los inventores tamizaron sueros de pacientes con MN para la reactividad contra las proteínas glomerulares humanas mediante inmunoelectrotransferencia (WB) y encontraron una glicoproteína de 200 kDa comúnmente detectada. Los inventores procedieron después a través de la purificación parcial y análisis por espectrometría de masa a identificar esta glicoproteína de 200 kDa. Es la PLA2R tipo-M. Se encuentran isoformas de PLA2R1 (180kDa) solubles y unidas a la membrana. *In vivo*, PLA2R se expresa en los riñones. Esta PLA2R nativa a partir del extracto de glomérulos se caracterizó adicionalmente y recién se ha determinado en un gel de proteína que es de aproximadamente 185 kDa. Después de la desglucosilación en el método descrito en la presente, es de aproximadamente 145 kDa.
- 50 Los inventores encontraron que aproximadamente el 70- 82% de los pacientes con MN tuvieron anticuerpos que son reactivos con una PLA2R recombinante (rPLA2R) por WB, y los sueros humanos eran capaces de inmunoprecipitar (IP) la proteína nativa a partir de los extractos de glomérulos humanos normales. Los sueros de control de voluntarios normales y controles nefróticos, así como sueros de pacientes MN previamente no-reactivos por WB, no identificaron la rPLA2R o el IP la proteína nativa. La mayoría de la inmunoglobulina reactiva en el suero de los pacientes es IgG4 , la subclase que predomina en los depósitos glomerulares en la MN idiopática. Los inventores muestran que PLA2R está presente en los podocitos, como se detectó por inmunofluorescencia en criosecciones de riñón humano. Además, tanto PLA2R como IgG4 se co-localizan en las muestras de biopsia de pacientes con MN en un patrón granular fino típico de los depósitos subepiteliales característicos de la enfermedad. Aunque no se desea estar limitado por la teoría, los auto-anticuerpos contra PLA2R en los sueros de los pacientes se unen a la PLA2R en el glomérulo renal, causando daños estructurales en los riñones y deterioro de la función renal. Aunque no se desea estar limitado por la teoría, la unión de los auto-anticuerpos a PLA2R causa lesión subletal en los podocitos e induce la proteinuria masiva. Con el objetivo principal en los anticuerpos MN idiopáticos que ahora se identifican como PLA2R, esto puede permitir la detección
- 60

temprana y menos invasiva de la enfermedad con un inmunoensayo diseñado para medir autoanticuerpos circulantes, y conducir además a un medio para el control de la respuesta al tratamiento. Adicionalmente, se detectaron además autoanticuerpos de PLA2R de la subclases IgG1, IgG2, e IgG3. Los inventores también encontraron que los autoanticuerpos son reactivos contra PLA2R de mamífero, tales como el PLA2R humano, conejo y cerdo.

5 El síndrome nefrótico, que se caracteriza por edema y grandes cantidades de proteína en la orina, es un trastorno relativamente común del riñón que tiene muchas causas posibles, incluyendo la nefropatía membranosa (MN), glomeruloesclerosis focal y segmentaria, enfermedad de cambios mínimos, nefropatía diabética, glomerulonefritis membranoproliferativa, así como otras causas. Aunque existen tratamientos no-específicos que mejoran algunos de los  
10 signos y síntomas de la afección nefrótica, el conocimiento específico de la enfermedad subyacente es generalmente necesario para guiar el tratamiento definitivo. Cuando un paciente con el síndrome nefrótico se evalúa inicialmente en forma ambulatoria o en el hospital, se indica generalmente por el médico un panel de pruebas de sangre para buscar causas potenciales que son detectables por serología (por ejemplo, la presencia de anticuerpos antinucleares (ANA) y/o anticuerpos anti-ADN bicatenario en el contexto de los hallazgos típicos en el sedimento pueden sugerir nefritis por  
15 lupus). En la actualidad no hay una prueba serológica para identificar MN, y el diagnóstico se basa exclusivamente en la biopsia renal, un procedimiento invasivo que requiere hospitalización durante la noche en muchas instituciones y que puede ser complicado por gran sangramiento interno. MN puede estar causada por una serie de factores secundarios, tales como el lupus eritematoso sistémico, hepatitis B, o sífilis, y las pruebas de sangre son rutinariamente enviadas a buscar estas causas (ANA, antígenos anti-hepatitis B, reagina plasmática rápida (RPR), respectivamente). Sin embargo,  
20 en los Estados Unidos, MN es más frecuentemente primaria o idiopática, en su origen y como se mencionó anteriormente, en la actualidad no existe prueba de sangre para esta forma, ya que el antígeno blanco de esta enfermedad autoinmunitaria no se había identificado hasta este punto.

25 La nefropatía membranosa, una causa frecuente de síndrome nefrótico en adultos, se considera ampliamente que es una enfermedad autoinmunitaria a pesar de la ignorancia del antígeno objetivo por mucho tiempo buscado. La mayor parte del apoyo a una base autoinmunitaria para MN proviene de décadas de investigación en el modelo en rata de nefritis Heymann (HN), que es prácticamente idéntico en el nivel patológico a la enfermedad humana. En el HN, el antígeno objetivo es megalina, una molécula de la familia del receptor de LDL que es responsable de la absorción semi-selectiva de las proteínas en el riñón. Está presente, en ratas, pero no en los seres humanos, en el podocito, y anticuerpos circulantes demostraron que unen la proteína *in situ*, lo que conduce al derramamiento de los complejos anticuerpo-antígeno en la membrana basal glomerular, que conducen a los depósitos subepiteliales característicos tanto  
30 de HN como MN.

35 Dado que los sueros de los individuos sanos control y pacientes con nefropatía no-MN no contienen o tienen muy baja cantidad o cantidad indetectable de auto-anticuerpos que reaccionan con PLA2R a diferencia de los sueros de los pacientes MN, la detección de la presencia de anticuerpos PLA2R se puede usar como una herramienta de diagnóstico para MN. Una simple muestra de sangre se puede usar para probar y detectar anticuerpos reactivos contra PLA2R. Un método de este tipo puede ser muy favorable sobre el método de diagnóstico actual de una biopsia de tejido renal que es una técnica invasiva. Como consecuencia, en una modalidad, se proporciona en la presente descripción un método  
40 para diagnosticar nefropatía membranosa en un sujeto, el método que comprende detectar la presencia de anticuerpos que son reactivos a un receptor de la fosfolipasa A2, en donde los anticuerpos se encuentran en una muestra obtenida de un sujeto. Los anticuerpos se pueden detectar mediante un inmunoensayo en donde se forma un complejo anticuerpo-proteína. El inmunoensayo puede ser un inmunoensayo serológico o un inmunoensayo nefelométrico. El sujeto es un mamífero, tal como un perro, un gato, o un humano. Los sujetos sanos que no tienen MN o no tienen ningún síntoma relacionado con MN, por ejemplo proteína en la orina, tienen auto-anticuerpos indetectables al receptor de la fosfolipasa A2 (PLA2R). Cuando se detectan anticuerpos que son reactivos a PLA2R en un sujeto sospechoso de tener MN, por ejemplo que tiene proteína en la orina, la presencia de los anticuerpos anti-PLA2R indica la probabilidad de que el sujeto tenga MN. Como un ejemplo, se entiende por cantidad indetectable de auto-anticuerpos anti-PLA2R, que no se observe banda visible en un análisis de inmunolectrotransferencia realizado como se describe en el Ejemplo  
50 1, en donde el suero humano se diluye 1:100 y se usa en los ensayos de transferencia descritos en la presente. Por cantidad muy baja de auto-anticuerpos anti-PLA2R, la cantidad baja es la cantidad promedio encontrada en una población de sujetos sanos no-MN. Los términos "sujetos", "individuos" o "pacientes" se usan indistintamente. La cantidad de auto-anticuerpos anti-PLA2R en un individuo sano no-MN o una población de individuos sanos no-MN como se determina por ELISA convencional o inmunolectrotransferencia que se expone en el Ejemplo 1 se puede considerar  
55 como el nivel de referencia anterior o el de control. Las muestras de suero recogidas a partir de los individuos sanos no-MN se diluyen 1: 100 y se usan en ensayos de inmunolectrotransferencia. La intensidad de la banda visible se cuantifica por densitometría y se calcula el valor promedio y un orden de la desviación estándar. Idealmente, una población tiene aproximadamente 25 individuos sanos no-MN, preferentemente más. Las estadísticas, el valor promedio y un orden de la desviación estándar se pueden cargar en el sistema informático y medio de almacenamiento de datos.  
60 Los pacientes que tienen al menos 10% más que esta cantidad promedio de los auto-anticuerpos anti-PLA2R es probable que tengan MN, especialmente si el paciente también presenta las características significativas clínicas de la enfermedad, por ejemplo proteinuria y síndrome nefrótico.

- 5 En una modalidad, se proporciona en la presente descripción un inmunoensayo que comprende: poner en contacto una muestra de un sujeto con una PLA2R o fragmento antigénico PLA2R de la misma; formar un complejo anticuerpo-proteína entre el anticuerpo presente en una muestra con el PLA2R o fragmento antigénico PLA2R de la misma; lavar para eliminar cualquier anticuerpo no unido; añadir un anticuerpo de detección que está marcado y es reactivo con el anticuerpo de la muestra; lavar para eliminar cualquier anticuerpo de detección marcado no unido; y convertir la etiqueta en una señal detectable, en donde la presencia de una señal detectable indica la probabilidad de MN, en el sujeto.
- 10 En algunas modalidades, el anticuerpo de detección está marcado mediante el enlace covalente a una enzima, marcado con un compuesto fluorescente o metal, o marcado con un compuesto quimioluminiscente. Por ejemplo, el anticuerpo de detección puede marcarse con catalasa y la conversión usa una composición de sustrato colorimétrico que comprende yoduro potásico, peróxido de hidrógeno y tiosulfato sódico; la enzima puede ser la alcohol deshidrogenasa y la conversión usa una composición de sustrato colorimétrico que comprende un alcohol, un indicador de pH y un tampón de pH, en donde el indicador de pH es el rojo neutral y el tampón de pH es el hidróxido de sodio-glicina; la enzima puede ser también hipoxantina oxidasa y la conversión usa una composición de sustrato colorimétrico que comprende xantina, una sal de tetrazolio y el ácido 4,5-dihidroxi-1,3-benceno disulfónico.
- 20 En una modalidad, el anticuerpo de detección es específicamente reactivo sólo a la especie del sujeto. Por ejemplo, si es humano, entonces el anticuerpo de detección es un anticuerpo anti-humano. Si el sujeto es un caballo, entonces el anticuerpo de detección es un anticuerpo anti-caballo. Si el sujeto es un perro, entonces el anticuerpo de detección es un anticuerpo anti-perro.
- 25 En una modalidad, la señal detectable se compara con un conjunto de señales detectables de una curva de titulación derivada de inmunoensayos de cantidades conocidas de PLA2R o fragmentos en cantidad creciente.
- 30 Se describe además un inmunoensayo que comprende: poner en contacto una muestra de un sujeto con una PLA2R o fragmento PLA2R de la misma; formar un complejo anticuerpo-proteína entre el anticuerpo presente en una muestra con la PLA2R o fragmento PLA2R de la misma; medir una intensidad de dispersión de luz resultante de la formación del complejo proteína-anticuerpo en donde la intensidad de dispersión de la luz de al menos 10% por encima de una intensidad de dispersión de luz del control indica la probabilidad de MN o recaída de MN en el sujeto. La intensidad de dispersión de luz del control es la de PLA2R o el fragmento de proteína PLA2R en ausencia de muestra. La intensidad de dispersión de luz del control puede ser la de PLA2R o el fragmento de proteína PLA2R en presencia de una muestra de un sujeto sano no-MN. La intensidad de dispersión de luz del control puede ser la intensidad de dispersión de luz promedio obtenida para una población de sujetos sanos no-MN. La intensidad de dispersión de luz se puede medir en un nefelómetro. El incremento puede ser al menos 20%, al menos 30%, al menos 50%, al menos 100%, al menos 200%, al menos 300%, al menos 500%, al menos 1000%, o más e incluyen todos los porcentajes entre 10-1000%.
- 40 En una modalidad, la MN en el sujeto es idiopática y no se realiza una biopsia del riñón en el sujeto. En una modalidad, el sujeto es un humano y la muestra del sujeto es una muestra de sangre, por ejemplo suero o plasma.
- En una modalidad, el PLA2R es una PLA2R de mamífero, tal como PLA2R humana o cerdo.
- En una modalidad, los anticuerpos anti-PLA2R son de la subclase de IgG: IgG1-4.
- 45 En una modalidad, el inmunoensayo es un inmunoensayo serológico.
- 50 En algunas modalidades, la PLA2R o fragmento proteína PLA2R de la misma se deposita sobre un soporte sólido o se puede acoplar para inmovilizar la proteína sobre el soporte. El soporte puede estar en el formato de una varilla graduada, una tira de prueba, una gota de látex, una microesfera o una placa de múltiples pocillos. En otra modalidad, una cantidad conocida de una PLA2R o fragmento de proteína PLA2R se deposita o acopla a un soporte sólido. El intervalo de proteínas es entre 0.1 ng - 1mg.
- 55 El inmunoensayo descrito en la presente invención puede realizarse para una pluralidad de muestras de un sujeto obtenida en un periodo de tiempo. Por ejemplo, las pluralidades de las muestras se obtienen cada dos o tres meses durante al menos un período de dos años. Por ejemplo, en una muestra de sangre que se recoge de un paciente diagnosticado con MN cada tres meses para monitorear el progreso de la afección y la eficacia del tratamiento inmunosupresor. El resultado de inmunoensayo de cada muestra de sangre se registra y la fecha de la muestra se indica. El resultado del inmunoensayo de cada muestra de sangre se compara con la obtenida para una muestra de sangre previa tomada tres meses antes. También se puede comparar con los resultados obtenidos durante el diagnóstico inicial antes del comienzo del tratamiento inmunosupresivo.
- 60 La señal detectable o intensidad de dispersión de luz de cada inmunoensayo pueden compararse con la señal detectable o intensidad de dispersión de luz de una muestra obtenida de un punto de tiempo anterior, en donde una

5 reducción de al menos 5%, al menos 10% o más de la señal detectable o intensidad de dispersión de luz indica tratamiento eficaz de MN en el sujeto, incluyendo una reducción de al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80 %, al menos 90%, 100% y todos los porcentajes entre 10 a 100%. El punto de tiempo previo puede ser el punto de tiempo previo consecutivo inmediato o un punto de tiempo más temprano, por ejemplo seis meses antes o el obtenida durante el diagnóstico inicial antes del comienzo del tratamiento inmunosupresivo.

10 En una modalidad, el método incluye la evaluación pronóstico de un sujeto que se trata por nefropatía membranosa, comprendiendo el método: (a) determinar en un primer punto de tiempo en una muestra de un sujeto un nivel de anticuerpos que son reactivos a una PLA2R; (b) determinar en un segundo punto de tiempo en una muestra del mismo sujeto un nivel de anticuerpos que son reactivos a una PLA2R, en donde el segundo punto de tiempo es después del primer punto de tiempo; y (c) comparar los niveles de anticuerpos obtenidos para los dos puntos de tiempos, en donde una disminución en el nivel de anticuerpos en el segundo punto de tiempo en comparación con el primer punto de tiempo indica que el tratamiento es eficaz. El nivel de los anticuerpos puede detectarse mediante un inmunoensayo en donde se forma un complejo anticuerpo-proteína. El sujeto inicialmente se diagnosticó con MN y tiene una cantidad detectable de auto-anticuerpos contra PLA2R. Después del tratamiento, por ejemplo, con la terapia inmunosupresiva, con el tiempo, hay una disminución en la cantidad de auto-anticuerpos detectables contra PLA2R. En un caso ideal, la cantidad de auto-anticuerpos debe descender por debajo del nivel detectable de los métodos de detección descritos en la presente y el sujeto se considerará en remisión por el trastorno. Una disminución en el nivel de los anticuerpos en el segundo punto de tiempo comparado con el primer punto de tiempo es al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, 100% y todos los porcentajes entre 10-100% de caída en el título de auto-anticuerpos contra PLA2R en el suero del segundo punto de tiempo comparado con el primer punto de tiempo. Por debajo del límite de detección es cuando el nivel de anticuerpos se reduce entre 95-100% o más en comparación con el primer punto de tiempo cuando el sujeto se diagnosticó inicialmente con MN y no se implementó ningún tratamiento. El ensayo usado es idéntico para todas las muestras recogidas a diferente puntos de tiempos del sujeto. La disminución del título de autoanticuerpos indica que el tratamiento es eficaz en el sujeto.

30 Puede que no haya disminución en el nivel de anticuerpos en el segundo punto tiempo en comparación con el primer punto de tiempo. En cambio, puede haber un aumento o un nivel estable de anticuerpos.

35 Puede haber un aumento en el nivel de anticuerpos en el segundo punto de tiempo en comparación con el primer punto de tiempo y el primer punto de tiempo no tiene auto-anticuerpos detectables. Esto indica que el paciente sufrió una recaída y repitió la MN.

40 Puede haber un aumento en el nivel de anticuerpos en el segundo punto de tiempo en comparación con el primer punto de tiempo y el primer punto de tiempo tiene auto-anticuerpos detectables. Esto indica empeoramiento de la enfermedad y/o carencia de tratamiento eficaz El aumento es al menos 30%, al menos 50% al menos 100%, al menos 200%, al menos 300%, al menos 500%, al menos 1000%, o más e incluye todos los porcentajes entre 10-1000%.

45 El nivel estable de anticuerpo, en donde los auto-anticuerpos detectables en los puntos de tiempos segundo y primero son comparativamente similares dentro de las varianzas del análisis estadístico, aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5% y todos los porcentajes entre 1%-5% y todos los porcentajes entre la desviación 1% -5% del nivel de auto-anticuerpos del primer punto de tiempo. El nivel estable de anticuerpo indica enfermedad estable, en donde el tratamiento ha sido de duración insuficiente (es decir, que se debe continuar si está clínicamente indicado) o es ineficaz.

Tal como se usa en la presente, el término "auto-anticuerpos" y "anticuerpos" contra PLA2R se usan indistintamente.

50 En otras modalidades, los inmunoensayos comprenden perlas recubiertas con proteína PLA2R nativa o recombinante como se describe en Binder SR., Lupus. 2006, 15:412-21. Comúnmente usados son las perlas de poliestireno que se tiñen para establecer una identidad única. La detección se realiza por citometría de flujo. La detección de autoanticuerpos usa tecnologías múltiplex. Otros tipos de inmunoensayos basados en perlas se conocen bien en la técnica, por ejemplo inmunoensayos de perlas láser y ensayos de perlas magnéticas asociadas (Fritzler, Marvin J; Fritzler, Mark L, Expert Opinion on Medical Diagnostics, 2009, págs. 3: 81-89).

55 En otra modalidad, el método proporcionado en la presente descripción incluye un método de evaluación pronóstico de un sujeto que se trata por nefropatía membranosa, comprendiendo el método: (a) determinar en un primer punto de tiempo en una muestra de un sujeto un nivel de anticuerpos que son reactivos a una PLA2R; y (b) determinar en un punto de tiempo subsiguiente, es decir, un segundo punto de tiempo en una muestra del mismo sujeto un nivel de anticuerpos que es reactivo a una PLA2R, en donde el segundo punto de tiempo es después del primer punto de tiempo; en donde auto-anticuerpos no detectables contra PLA2R en el segundo punto de tiempo en comparación con el primer punto de tiempo indica que el sujeto está en remisión para MN. El nivel de los anticuerpos puede detectarse

mediante un inmunoensayo en donde se forma un complejo anticuerpo-proteína. El límite de detección es cuando el nivel de anticuerpos se reduce entre 95-100% y sin que se compare con el primer punto de tiempo.

5 En otra modalidad adicional, el método proporcionado en la presente descripción incluye un método de evaluación pronóstico de un sujeto para nefropatía membranosa, comprendiendo el método: (a) determinar en un primer punto de tiempo en una muestra de un sujeto un nivel de anticuerpos que son reactivos a una PLA2R; y (b) determinar en un punto de tiempo subsiguiente, es decir, en un segundo punto de tiempo en una muestra del mismo sujeto un nivel de anticuerpos que es reactivo a una PLA2R, en donde el segundo punto de tiempo es después del primer punto de tiempo; y c) comparar los niveles de anticuerpos de los dos puntos de tiempo, en donde un aumento de al menos 5% en el nivel de anticuerpos en el segundo punto de tiempo en comparación con el primer punto de tiempo indica que el sujeto está en recaída de MN. El nivel de los anticuerpos puede detectarse mediante un inmunoensayo en donde se forma un complejo anticuerpo-proteína. El incremento es al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 50%, al menos 100%, al menos 200%, al menos 300%, al menos 500%, al menos 1000%, o más e incluye todos los porcentajes entre 10-1000%.

15 En una modalidad, el sujeto se trató con éxito para MN, no tiene auto-anticuerpos detectables contra PLA2R en circulación sanguínea y actualmente no se encuentra en tratamiento alguno para MN. En este sujeto, el primer punto de tiempo no tiene auto-anticuerpos detectables. El sujeto inicialmente se diagnosticó con MN y tiene una cantidad detectable de auto-anticuerpos contra PLA2R. Después del tratamiento, por ejemplo, con la terapia inmunosupresiva, en el tiempo, la cantidad de auto-anticuerpos contra PLA2R se reduce por debajo del nivel detectable de los métodos de detección descritos en la presente y el sujeto está en remisión para MN. El resurgimiento de una cantidad detectable de auto-anticuerpos contra PLA2R, y el aumento gradual de los auto-anticuerpos en el tiempo indica que la MN se ha repetido en el sujeto.

20 En otra modalidad, el sujeto está siendo tratado actualmente para MN y tiene auto-anticuerpos detectables contra PLA2R en la circulación sanguínea. Un aumento en el nivel de anticuerpos en el segundo punto de tiempo en comparación con el primer punto de tiempo indica que la condición de la enfermedad es el deterioro y el tratamiento en el régimen actual no es eficaz para frenar/detener la enfermedad.

25 En otra modalidad, el sujeto que se trata actualmente para MN, tiene auto-anticuerpos detectables contra PLA2R en la circulación sanguínea y el nivel de autoanticuerpos en los puntos de tiempo primero y segundo son comparativamente similares dentro de las varianzas del análisis estadístico. Esto indica que el sujeto tiene un nivel constante de auto-anticuerpos durante el tratamiento, lo que indica que el tratamiento ha sido de duración insuficiente (es decir, que se debe continuar si está clínicamente indicado) o es ineficaz.

30 En una modalidad, la MN es idiopática. El sujeto que se sospecha de tener MN ha dado negativo para las causas habituales de MN, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, hepatitis B y sífilis. Un médico experto puede, en el proceso de eliminación, descartar todas las causas posibles de MN. Lo que queda es el diagnóstico provisional de MN a partir de una causa oscura o desconocida, tal como auto-anticuerpos posiblemente auto-inmunes contra PLA2R. El método de diagnóstico no invasivo descrito en la presente se puede aplicar después, a dicho sujeto para la confirmación.

35 En una modalidad, el método de diagnóstico de MN descrito en la presente se aplica a un paciente que presenta síntomas de MN sin haber experimentado el tamizaje de rutina para descartar todas las causas posibles para la MN. Los métodos descritos en la presente pueden ser parte del conjunto de pruebas de rutina para fines de diagnóstico realizadas en un paciente que presenta síntomas de MN tal como proteinuria. El ensayo puede ser un inmunoensayo en donde se forma un complejo anticuerpo-proteína, por ejemplo, ensayos inmunológicos serológicos. Tales pacientes no se les realizaron biopsia para el diagnóstico confirmatorio de MN. Del mismo modo, los métodos descritos en la presente pueden ser parte del conjunto de pruebas inmunológicas serológicas realizadas de rutina en un paciente que ya se sabe que tiene MN por biopsia o por pruebas serológicas, que se trata por MN. Los métodos son útiles para la supervisión de la eficacia de las terapias inmunosupresivas y evaluación pronóstica en el paciente.

40 En una modalidad, el sujeto es un mamífero. En otra modalidad, el sujeto es un humano. Se prevé que los métodos descritos en la presente son aplicables a cualquier mamífero que tiene riñones, expresa PLA2R y tiene un sistema inmune que comprende anticuerpos.

45 En una modalidad, el sujeto que se sospechosa de tener MN no se ha sometido a una biopsia renal para el diagnóstico confirmatorio de MN.

50 Los inventores encontraron que los anticuerpos en los sueros de pacientes MN fueron inmunológicamente reactivos contra PLA2R de mamífero tales como PLA2R de humano y de conejo. Por lo tanto, se abarca en la presente descripción, los métodos descritos en la presente que comprenden detectar los anticuerpos que son reactivos contra el receptor de la fosfolipasa A2 humana o PLA2R porcina. Como se usa en la presente, el término "reactivo contra", "reactivo a" o "reactivo con" se refiere a los anticuerpos que reconocen la PLA2R de humano o cerdo y la unión a la

PLA2R. El reconocimiento y unión son las interacciones estándar antígeno-anticuerpo que están bien caracterizada por la bioquímica e inmunología.

5 En una modalidad, la muestra del sujeto es una muestra de sangre. En otras modalidades, la muestra es una muestra de sangre entera, suero o plasma.

En una modalidad, los anticuerpos son de la subclase IgG4. En otras modalidades, los auto-anticuerpos PLA2R son las subclases IgG3 e IgG1. En aun otras modalidades, auto-anticuerpos PLA2R son de las subclases de IgG: IgG1-4.

10 En una modalidad, el tratamiento para la MN es una terapia inmunosupresiva, por ejemplo, ciclosporina, tacrolimus, azatioprina, infliximab, omalizumab, daclizumab, adalimumab, eculizumab, efalizumab, natalizumab, omalizumab y rapamicina. En una modalidad adicional, el tratamiento inmunosupresivo para la MN, además, incluye pero no se limita a ciclofosfamida, clorambucilo, y rituximab.

15 En algunas modalidades, por los métodos descritos en la presente, la detección de auto-anticuerpos contra PLA2R se realiza mediante un inmunoensayo serológico tal como los ensayos de inmunoabsorción ligados a enzima (ELISAs). ELISAs y otros inmunoensayos conocidos en la técnica se crean generalmente usando protocolos estándar, con la variación principal siendo el antígeno objetivo o de captura. Para los métodos descritos en la presente, el antígeno es PLA2R humano, PLA2R porcina, o fragmentos de las mismas. PLA2R recombinante completo se expresa en un línea celular de mamífero o insecto se puede purificar y usar como antígeno de captura. La proteína se puede expresar con una etiqueta FLAG N- o C-terminal para facilitar la purificación de otras proteínas derivadas de la línea celular. Placas ELISA se recubrirán con PLA2R o un fragmento a una concentración constante. La placa se puede bloquear con caseína bovina o albúmina sérica u otros agentes de bloqueo para evitar la unión no específica de las muestras. El suero humano a ensayar se puede añadir a los pocillos en diluciones estándar (1:40, 1:80, 1:160, etc.) seguido por los lavados de rutina. La IgG unida se puede detectar con un anticuerpo secundario anti-IgG humano unido a peroxidasa de rábano picante. Después de una serie de lavados, el sustrato colorimétrico se puede añadir a todos los pocillos y desarrollar. La placa de ELISA se puede leer en un lector de placa de microtitulación Usando muestras de suero MN que se conoce que son positivas o negativas, así como el suero de voluntarios humanos normales, es posible establecer títulos de corte adecuados para definir lo que constituirá un resultado de prueba positivo. Los sujetos sanos que no tienen MN o no tienen ningún síntoma relacionado con MN, por ejemplo proteína en la orina, tienen auto-anticuerpos indetectables a PLA2R. Cuando se detectan anticuerpos que son reactivos a PLA2R en un sujeto sospechoso de tener MN, por ejemplo que tiene proteína en la orina, la presencia de los anticuerpos anti-PLA2R indica la probabilidad de que el sujeto tenga MN.

35 En una modalidad, un ELISA puede proporcionar un ensayo serológico simple para MN inmunológicamente activa, es decir MN activa con autoanticuerpos contra PLA2R. El ensayo serológico sencillo se puede pedir con otras pruebas de diagnóstico ampliamente usadas o de cualquier otra forma de informativos de sangre en pacientes con proteinuria intensa, tales como los anticuerpos anti-nucleares, anticuerpos anti-hepatitis-B y -C, y niveles del complemento C3 y C4. En los casos de pacientes con prueba positiva en este ensayo, puede no ser necesaria la biopsia del riñón para guiar el tratamiento, a menos que otros rasgos atípicos se presenten que puedan justificar una biopsia. En aquellos pacientes con prueba negativa y que todavía tienen proteinuria inexplicable, sin embargo, a pesar de todo se indica una biopsia renal. Un inmunoensayo como se describe puede ser considerablemente más barato que la biopsia renal, que frecuentemente requiere una admisión en el hospital durante la noche. También es mucho más conveniente tanto para el paciente como el médico.

45 Es un hecho conocido que la proteinuria puede persistir (transitoria o permanente) en pacientes MN incluso después que la enfermedad inmunológica se termina, debido a los cambios estructurales en el glomérulo. La dependencia de los niveles de excreción de proteína por sí sola puede conducir al tratamiento de los pacientes con fármacos inmunosupresivos tóxicos mucho más tiempo del necesario. Así, la supervisión de la desaparición de los auto-anticuerpos con el ELISA descrito ayudará a definir un punto de transición en el tratamiento de la nefropatía membranosa cuando la terapia inmunosupresiva debe detenerse pero la terapia anti-proteinúrica (por ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina) debe continuar.

55 Se describe un método de tratamiento de la nefropatía membranosa en un sujeto, el método comprende administrar una cantidad eficaz de PLA2R o fragmentos de la misma o un vector que expresa una PLA2R o fragmentos de la misma. Al proporcionar PLA2R soluble o fragmentos de la misma, la proteína soluble puede funcionar como antígenos de señuelo y secuestrar los auto-anticuerpos lejos de la PLA2R en los glomérulos renales, reduciendo así el daño potencial en el riñón. La PLA2R puede ser la PLA2R humana o porcina. Los fragmentos adecuados para el tratamiento o adsorción de los auto-anticuerpos para PLA2R a partir del suero, son fragmentos que comprenden CTLDs o CRD 4, 5, 6 de PLA2R. En otra modalidad, los fragmentos comprenden el dominio extracelular de PLA2R humana o porcina. En una modalidad, el fragmento es la sec. con núm. de ident. 5 o porciones menores de la sec. con núm. de ident. 5, tal como al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95 que incluyen todos los porcentajes entre 10-95%. Además se contemplan péptidos entre los

residuos de aminoácidos 10-50 derivados de la secuencia de sec. con núm. de ident.: 5 que se puede usar en el tratamiento de MN. Un cóctel de varios péptidos se pueden usar para el tratamiento. Los péptidos previsto se pueden fusionar con otras proteínas de vida media en suero más larga, péptidos enlazados en tándem o péptidos circulares.

5 En este sentido, la nefropatía membranosa puede ser idiopática. El sujeto puede dar positivo a la prueba de anticuerpos reactivos contra una PLA2R. Los autoanticuerpos pueden ser reactivos a la PLA2R humana o PLA2R porcina.

10 Se describe además un método de tratamiento de la nefropatía membranosa en un sujeto, el método que comprende eliminar un anticuerpo que es reactivo a una PLA2R en una muestra de un sujeto. Los anticuerpos se eliminan de la sangre por inmovilización con PLA2R o fragmentos de la misma como el antígeno, y la muestra se devuelve nuevamente al sujeto después de la eliminación de los anticuerpos. Los fragmentos adecuados de adsorción son fragmentos que comprenden los CTLDs o CRDs 4, 5, 6 de PLA2R. Para el precursor 1 isoforma 1 del receptor PLA2R humano (núm. de acceso del GENBANK™ NP\_031392.3, sec. con núm. de ident.: 2), un fragmento adecuado puede estar en los residuos de aminoácidos 650 a 1100 que consisten en las CRDs 4, 5, 6 de la PLA2R.

15 En una modalidad, se proporciona en la presente descripción una composición para uso en el tratamiento de la nefropatía membranosa idiopática, la composición que comprende una PLA2R o fragmentos antigénicos de la misma.

20 En otra modalidad, se proporciona en la presente descripción un uso de una cantidad eficaz de PLA2R o fragmentos antigénicos de la misma o un vector que expresa una PLA2R o fragmentos antigénicos de la misma en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la nefropatía membranosa en un sujeto.

25 En una modalidad, la muestra es sangre. En otras modalidades, la muestra es suero o plasma. En una modalidad, el sujeto es un humano la nefropatía membranosa es idiopática. Los auto-anticuerpos son reactivos al receptor de PLA2R humana o de PLA2R porcina. En una modalidad, los anticuerpos son de la subclase IgG4. En otras modalidades, los auto-anticuerpos PLA2R son las subclases IgG3, IgG2, e IgG1. Aun en otras modalidades, auto-anticuerpos PLA2R son de las subclases de IgG: IgG1-4. La inmovilización de auto-anticuerpos contra PLA2R ayuda a reducir la cantidad de auto-anticuerpos circulantes y reducir de ese modo el daño potencial en el riñón. Este tratamiento se puede aplicar inicialmente después de la confirmación inmunológica de la presencia de los auto-anticuerpos reactivos contra PLA2R y antes del comienzo de cualquier terapia inmunosupresiva. Esto es especialmente útil durante este primer período antes de la terapia inmunosupresiva que puede tener un efecto sobre el sistema inmune y la producción de auto-anticuerpos en el sujeto.

35 La inmovilización de auto-anticuerpos contra PLA2R puede producirse pasando la sangre, suero o plasma sobre el PLA2R inmovilizado. PLA2R o fragmentos de recombinante humano o porcino pueden ser inmovilizados en matrices inertes y estériles que se conocen en la técnica, tal como sefarosa. Los autoanticuerpos contra PLA2R se unirán al PLA2R o fragmentos inmovilizados y permanecerán indirectamente unido a la matriz. La sangre, suero o plasma se recolecta después. Esta sangre, suero o plasma resultante no deben tener auto-anticuerpos detectables o reducidos contra PLA2R. El procedimiento de inmovilización debe realizarse bajo condiciones estériles. La sangre, suero o plasma recolectadas que ahora se agota de auto-anticuerpos contra PLA2R se puede transfundir de nuevo en el paciente.

*Dispositivos, estuches, sistema informático y almacenamiento de datos informáticos.*

45 Se describe además un dispositivo para identificar la presencia o el nivel de anticuerpos que son reactivos a una PLA2R en una muestra de un sujeto que comprende: al menos una proteína PLA2R o fragmentos de la misma; y al menos un soporte sólido en donde la proteína PLA2R o fragmentos de la misma se deposita sobre el soporte. En una modalidad, la proteína PLA2R o fragmentos de la misma que se deposita sobre el soporte sólido se inmoviliza en el soporte. La proteína PLA2R puede ser una proteína PLA2R humana o porcina. El soporte puede estar en el formato de una varilla graduada, una tira de prueba, una gota de látex, una microesfera o una placa de múltiples pocillos.

El sujeto puede ser un humano y una biopsia de riñón humano no se realiza en el sujeto La muestra del sujeto puede ser una muestra de sangre.

55 Los dispositivos o estuches descritos en la presente pueden comprender además una segunda proteína PLA2R marcada o un fragmento de la misma que produce una señal detectable, en donde el anticuerpo de detección es específico para los anticuerpos que son reactivos a una PLA2R en la muestra del sujeto y el anticuerpo de detección produce una señal detectable; o una cubeta de nefelómetro.

60 El dispositivo puede realizar un inmunoensayo en donde se forma un complejo anticuerpo-proteína, tal como un inmunoensayo serológico o un inmunoensayo nefelométrico

Por ejemplo, los dispositivos descritos en la presente pueden facilitar el diagnóstico de la nefropatía membranosa en un

sujeto, en donde una cantidad detectable de anticuerpos que son reactivos a una PLA2R indica la probabilidad de nefropatía membranosa en el sujeto.

Se describen además en la presente estuches que comprenden dispositivos descritos en la presente y un anticuerpo de detección, en donde el anticuerpo de detección es específico para los anticuerpos que son reactivos a un PLA2R en la muestra del sujeto y produce una señal detectable. El estuche puede incluir una segunda proteína PLA2R marcada o un fragmento de la misma que produce una señal detectable. El estuche puede incluir además una cubeta de nefelómetro.

Cualquier soporte sólido se puede usar, que incluyen pero sin limitarse a, membrana de nitrocelulosa, membrana de nailon, polímeros orgánicos sólidos, tales como poliestireno, o varillas graduadas laminados tales como descrito en la patente de los Estados Unidos 5,550,375. El uso de "varillas graduadas" o tiras de prueba y otros soportes sólidos se han descrito en la técnica en el contexto de un inmunoensayo para una serie de antígenos. Tres patentes de Estados Unidos (patente de los Estados Unidos núm. 4,444,880, concedida a H. Tom; patente de Estados Unidos núm. 4,305,924, concedida a R. N. Piasio; y patente de Estados Unidos núm. 4,135,884, concedida a J. T. Shen) describen el uso de la tecnología "varilla graduada" para detectar antígenos solubles a través de ensayos inmunoquímicos. Los aparatos y métodos de estas tres patentes describen ampliamente un primer componente fijo a una superficie sólida en una "varilla graduada" que se expone a una solución que contiene un antígeno soluble que se une al componente fijo sobre la "varilla graduada," antes de la detección del complejo antígeno-componente sobre la varilla. La tecnología de "varilla graduada" puede ser fácilmente adaptada para la presente invención por una persona con experiencia en la técnica. Como se describe en la presente, el antígeno PLA2R se deposita sobre el soporte y debe detectarse el auto-anticuerpo.

Los ejemplos de estuches incluyen, pero sin limitarse a los estuches de ensayo de ELISA, y estuches que comprenden las tiras de prueba y varillas graduadas. En un estuche de ELISA, una cantidad en exceso de antígeno PLA2R, se inmoviliza en, sobre un soporte sólido. Una muestra que contiene una cantidad desconocida de autoanticuerpos para PLA2R se añade a la PLA2R inmovilizada, lo que resulta en la formación de un complejo consistente de la proteína y el anticuerpo. El complejo se detecta mediante un segundo anticuerpo marcado que es específico además para el auto-anticuerpo. La cantidad de marcador detectada es una medida de la cantidad de autoanticuerpo presente en la muestra (ver el ejemplo 3).

En algunos ejemplos de los estuches descritos en la presente, el estuche comprende una tira de prueba o una varilla graduada.

En algunos ejemplos de los estuches descritos en la presente, los anticuerpos marcados se marcan de forma detectable mediante el marcaje enzimático, marcaje fluorescente, marcaje con biotina o marcaje con radioisótopo. Otros marcadores incluyen pero sin limitarse a gotas de oro coloidal y látex. Las gotas de látex pueden ser también de color. El método para marcar los anticuerpos se conoce en la técnica, por ejemplo, como se describe en "Colloidal Gold. Principles. Methods and Applications", Hayat MA (ed.) (1989-91). Vols 1-3, Academic press, Londres; en "Techniques in Immunocytochemistry", Bullock GR y Petrusz P (eds) (1982-90) Vols 1, 2, 3, y 4, Academic Press, Londres; en "Principles of Biological Microtechnique", Baker JR (1970), Methuen, Londres; Lillie RD (1965), Histochemical Technique and practical Histochemistry, 3ra. ed, McGraw Hill, Nueva York; Berryman MA, y otros (1992), J. Histochem Cytochem 40, 6, 845-857.

En una técnica típica de marcaje con oro coloidal, el color rojo único de la etiqueta de oro acumulado, cuando se observa por el flujo lateral o transversal a lo largo de una membrana en la que un antígeno se captura por un anticuerpo inmovilizado, o por la observación de la intensidad del color rojo en solución, proporciona un método extremadamente sensible para detectar cantidades de subnanogramos de proteínas en solución. Un conjugado de oro coloidal consiste en una suspensión de partículas de oro recubiertas con una proteína o macromolécula seleccionada (tales como un anticuerpo o una porción basada en anticuerpos). Las partículas de oro se pueden fabricar a cualquier tamaño elegido de 1-250nm. Este sistema de detección de sonda de oro, cuando se incuba con un objetivo específico, tal como con una sección de tejido, revelará el objetivo a través de la visibilidad de las propias partículas de oro. Para la detección visual, las partículas de oro revelarán también el antígeno inmovilizado sobre una fase sólida tal como una membrana de transferencia a través del color rojo acumulado de la solución de oro. La mejoría con plata de este precipitado de oro da también sensibilidad de detección adicional. Los proveedores de reactivos de oro coloidal para el marcaje están disponibles de SPI-MARK™. Gota de látex de poliestireno de tamaño de 200 nm, gota de látex de color recubierta con anticuerpo SIGMA ALDRICH®, Molecular Probes, Bangs Laboratory Inc., y AGILENT® Technologies.

En otros ejemplos de los estuches descritos en la presente, al menos uno de los anticuerpos marcados comprende un anticuerpo marcado con enzima. El anti-PLA2R que se une y captura por el PLA2R inmovilizado sobre el soporte sólido (por ejemplo, pocillos de placas de microtitulación) se identifica adicionando un sustrato cromogénico para la enzima conjugada con el anti-anticuerpo, por ejemplo, anti-IgG humana, y la producción del color detectado por un dispositivo óptico tal como un lector de placa de ELISA.

- 5 Otros sistemas de detección se pueden usar también, por ejemplo, un sistema de biotina-estreptavidina. La cuantificación se determina utilizando un conjugado de estreptavidina-peroxidasa y un sustrato cromogénico. Tales estuches de detección de peroxidasa estreptavidina están comercialmente disponibles, por ejemplo de DAKO; Carpintería, CA.
- 10 Los anticuerpos de detección y PLA2R alternativamente se pueden marcar con cualquiera de una serie de compuestos fluorescentes tales como isotiocianato de fluoresceína, europio, amarillo lucifer, isotiocianato de rodamina B (Wood, P. En: Principles and Practice of Immunoassay, Stockton Press, Nueva York, págs 365-392 (1991)) para uso en inmunoensayos. En conjunto con las técnicas conocidas para la separación de los complejos anticuerpo-antígeno, estos fluoróforos se pueden usar para cuantificar el nivel de autoanticuerpos. Lo mismo aplica al inmunoensayo quimioluminescente en cuyo caso el anticuerpo o PLA2R puede marcarse con isoluminol o ésteres de acridinio (Krodel, E. y otros, en: Bioluminescence and Chemiluminescence: Current Status, John Wiley y Sons Inc. Nueva York, págs 107-110 (1991); Weeks, I. y otros, Clin. Chem., 29:1480-1483 (1983)). Radioimmunoassay (Kashyap, M. L. y otros, J. Clin. Invest., 60:171-180 (1977)) es otra técnica en la que el anticuerpo de detección se puede usar después de marcar con un isótopo radiactivo tal como <sup>125</sup>I. Algunos de estos inmunoensayos se puede automatizar fácilmente por el uso de instrumentos adecuados, como la IMX™ (Abbott, Irving, Tex.) para un inmunoensayo fluorescente y Ciba Coming ACS 180™ (Ciba Corning, Medfield, Mass.) para un inmunoensayo quimioluminiscente.
- 20 En algunos ejemplos, los estuches descritos en la presente comprenden además estándares de cantidades conocidas de PLA2R o fragmentos de la misma.
- 25 En algunos ejemplos, los estuches descritos en la presente comprenden, además, valores de referencia de los niveles de anticuerpos anti-PLA2R. Los valores de referencia son niveles promedios de anticuerpos anti-PLA2R en muestras de una población de humanos sanos no-MN. Los valores de referencia se pueden proporcionar como valores numéricos, o como estándar de cantidades conocidas o título de anticuerpos anti-PLA2R presentados en pg/ml-µg/ml.
- 30 En algunos ejemplos, los estuches descritos en la presente comprenden además al menos un recipiente de recolección de muestra para la recolección de la muestra. Los dispositivos y recipiente de recolección incluyen, pero no se limitan a las jeringas, lancetas, tubos de recolección de sangre BD VACUTAINER®.
- 35 En algunos ejemplos, los estuches descritos en la presente comprenden además instrucciones para usar el estuche y la interpretación de los resultados. Por ejemplo, un gráfico que muestra la interpretación de los resultados Fig. 9.
- 40 Como un ejemplo, un estuche de ensayo típico basado en ELISA puede implicar dispensar una muestra que contiene el suero en los pocillos de la placa de microtitulación, preferentemente en duplicados o triplicados (como en la Fig. 11). Los pocillos se recubrieron con PLA2R inmovilizado. Además, una cantidad fija de la anti-IgG estándar suministrada con el estuche se dispensa también en los pocillos de referencia de la placa de microtitulación, preferentemente también en duplicados o triplicados, según las instrucciones del estuche. Esa cantidad fija de anti-IgG estándar correspondiente a al menos dos veces el valor de la referencia de los auto-anticuerpos anti-PLA2R normalmente presentes en los sujetos sanos. Se puede añadir a otro conjunto de pocillos de referencia una segunda cantidad fija del anti-IgG estándar correspondiente al valor dos veces inferior que el de referencia de los auto-anticuerpos anti-PLA2R. Posteriormente, se añade el anticuerpo de detección marcado, específico para los auto-anticuerpos anti-PLA2R tanto en los pocillos de muestra y de referencia, por ejemplo un anticuerpo anti-IgG. Este es un ensayo ELISA "sándwich", donde los auto-anticuerpos anti-PLA2R se encuentran como sándwich entre PLA2R y un anticuerpo anti-IgG. Dado que la cantidad de etiqueta detectada es una medida de la cantidad de auto-anticuerpos anti-PLA2R presentes en los pocillos, las cantidades de etiqueta detectadas en los varios pocillos proporciona medios para comparar el nivel de los auto-anticuerpos anti-PLA2R en la muestra con el valor de referencia de los auto-anticuerpos anti-PLA2R normalmente presentes en el sujeto sano. Por ejemplo, si la etiqueta es de gotas de látex de color, una mayor intensidad del color en los pocillos de muestra en comparación con los pocillos de referencia indica que el nivel de auto-anticuerpos anti-PLA2R en la muestra es mayor que dos veces el valor de referencia de los auto-anticuerpos anti-PLA2R normalmente presentes en sujeto sano. Por otra parte, si la intensidad del color en los pocillos de muestra es inferior en comparación con el pocillo de referencia, que indica que el nivel de los auto-anticuerpos anti-PLA2R en la muestra es al menos dos veces inferior que el valor de referencia del auto-anticuerpo anti-PLA2R normalmente presente en el sujeto sano.
- 55 Las aplicaciones de la invención se refieren también a los sistemas (y los medios informáticos legibles para hacer os sistemas informáticos) para realizar un método para el diagnóstico de MN en un sujeto, evaluar el riesgo de un sujeto de desarrollar MN, o seguimiento de la eficacia del tratamiento de un sujeto con MN.
- 60 En una aplicación, se describe en la presente un sistema que comprende: un módulo de medición que mide la información de auto-anticuerpo que comprende una señal detectable de un inmunoensayo que indica la presencia o el nivel de anticuerpos que son reactivos a una PLA2R a partir de una muestra obtenida de un sujeto; un módulo de almacenamiento configurado para la salida de datos almacenados desde el módulo de medición; un módulo de

comparación adaptado para comparar los datos almacenados en el módulo de almacenamiento con datos de referencia y/o control, y para proporcionar un contenido recuperado, y un módulo de salida para la visualización del contenido recuperado por el usuario, en donde la presencia de una cantidad detectable de anticuerpos reactivos contra PLA2R en el contenido recuperado indica que el sujeto tiene MN o tiene una recaída de MN.

5

En una aplicación, se describe en la presente un sistema para facilitar la evaluación pronóstico de la nefropatía membranosa (MN) en un sujeto, que comprende: un módulo de determinación configurado para recibir y dar salida a la información del auto-anticuerpo de un PLA2R a partir de una muestra obtenida de un sujeto, en donde la información de los auto-anticuerpos mide el nivel de auto-anticuerpos que son reactivos a la PLA2R; un módulo de almacenamiento configurado para almacenar información de salida desde el módulo de determinación; un módulo de comparación adaptado para comparar los datos almacenados en el módulo de almacenamiento con los datos de control y/o de referencia, y para proporcionar un contenido de comparación, y un módulo de salida para la visualización del contenido de comparación para el usuario, en donde si no hay ninguna cantidad detectable de auto-anticuerpos reactivos contra PLA2R entonces el sujeto está en remisión o si hay una reducción de al menos 10% a una lectura previa, entonces el tratamiento de MN es eficaz en el sujeto.

10

15

En algunas aplicaciones, los datos de control comprenden datos previos del mismo sujeto en donde los datos previos indicaron cantidades detectables de auto-anticuerpos.

20

En una aplicación, se describe en la presente un medio de almacenamiento informático legible que comprende: un módulo de almacenamiento de datos que contiene datos de una muestra obtenida de un sujeto que representa un nivel de señal de un inmunoensayo para anticuerpos que son reactivos a una PLA2R; un módulo de comparación que compara los datos almacenados en el módulo de almacenamiento de datos con unos datos de referencia y/o datos de control, y para proporcionar un contenido de comparación, y un módulo de salida que visualiza el contenido de comparación para el usuario, en donde la presencia de una cantidad detectable de anticuerpos reactivos contra PLA2R de al menos 10% en relación con los datos de referencia y/o datos de control indica que el sujeto tiene MN o tiene una recaída de MN.

25

30

En una aplicación, el dato de control comprende datos de una población de individuos sanos no-MN, que es la señal de detección obtenida usando sueros humanos de individuos sanos no-MN en dilución 1:100 con PBS 1X para inmunoreaccionar con 0.5 µg de PLA2R nativo, en donde el anticuerpo anti-IgG humano con peroxidasa de rábano picante es el anticuerpo de detección marcado y la señal de detección es la quimiluminiscencia.

35

Las aplicaciones de la invención se pueden describir a través de módulos funcionales, que se definen por instrucciones informáticas ejecutables grabadas en medios informáticos legibles y hacen que una computadora realice las etapas del método cuando se ejecuta. Los módulos son segregados por la función en aras de la claridad. Sin embargo, debe entenderse que los módulos/sistemas no requieren corresponderse con bloques de código discretos y las funciones descritas pueden llevarse a cabo por la ejecución de varias porciones de código almacenadas en varios medios y ejecutarse a diferentes tiempos. Además, se debe apreciar que los módulos pueden realizar otras funciones, por lo tanto los módulos no se limitan a tener alguna de las funciones o un conjunto de funciones en particular.

40

Los medios de almacenamiento informático legible # 30 pueden ser cualquiera de los medios tangibles disponibles que se pueden acceder con una computadora. El medio de almacenamiento informático legible incluye el medio tangible volátil y no volátil, removible y no-removible implementado en cualquier método o tecnología para el almacenamiento de la información tales como instrucciones informáticas legibles, estructuras de datos, módulos de programa u otros datos. El medio de almacenamiento informático legible incluye, pero no se limita a, RAM (memoria de acceso aleatorio), ROM (memoria sólo de lectura), EPROM (memoria sólo de lectura programable y borrrable), EEPROM (memoria de sólo lectura eléctricamente programable y borrrable), memoria flash u otra tecnología de memoria, CD-ROM (memoria de sólo lectura de disco compacto), DVD (discos versátiles digitales) u otros medios de almacenamiento óptico, casetes magnéticos, cinta magnética, magnético almacenamiento en disco o otros medios de almacenamiento magnético, otros tipos de memoria volátil y no volátil, y cualquier otro medio tangible que puede usarse para almacenar la información deseada y que se puede acceder con una computadora incluyendo cualquier combinación adecuada de las anteriores.

45

50

Los datos informáticos legibles incorporados en uno o más medios informáticos legibles pueden definir las instrucciones, por ejemplo, como parte de uno o más programas que, como resultado de que se ejecuten por una computadora, instruyen a la computadora para realizar una o más de las funciones descritas en la presente, y/o varias modalidades, variaciones y combinaciones de las mismas. Tales instrucciones pueden escribirse en cualquiera de una pluralidad de lenguajes de programación, por ejemplo, Java, J#, Visual Basic, C, C#, C++, Fortran, Pascal, Eiffel, Basic, lenguaje de ensamblaje COBOL, y similares, o cualquiera de una variedad de combinaciones de los mismos. Los medios informáticos legibles en los que se incorporan tales instrucciones pueden residir en uno o más de los componentes ya sean de un sistema o un medio de almacenamiento informático legible descrito en la presente, pueden distribuirse a través de uno o más de tales componentes.

55

60

Los medios informáticos legibles se pueden transportar de manera que las instrucciones almacenadas del mismo se pueden cargar en cualquier recurso informático que implemente los aspectos de la presente invención discutidos en la presente descripción. Adicionalmente, debe apreciarse que las instrucciones almacenadas en el medio informático legible, descrito anteriormente, no se limita a las instrucciones incorporadas como parte de un programa de aplicación que se ejecuta en una computadora de red. Por el contrario, las instrucciones se pueden incorporar como cualquier tipo de código informático (por ejemplo, software o microcódigo) que pueden emplearse para programar una computadora que implemente los aspectos de la presente invención. Las instrucciones informáticas ejecutables se pueden escribir en un lenguaje de computadora adecuado o combinación de varios lenguajes. Los métodos básicos de bioinformática se conocen por las personas de habilidad ordinaria en la técnica y se describen en, por ejemplo, Setubal y Meidanis y otros, *Introduction to Computational Biology Methods* (PWS Publishing Company, Boston, 1997); Salzberg, Searles, Kasif, (Ed.), *Computational Methods in Molecular Biology*, (Elsevier, Amsterdam, 1998); Rashidi y Buehler, *Bioinformatics Basics: Application in Biological Science and Medicine* (CRC Press, London, 2000) y Ouelette and Bzevanis *Bioinformatics: A Practical Guide for Analysis of Gene and Proteins* (Wiley & Sons, Inc., 2da ed., 2001).

Los módulos funcionales incluyen como mínimo un módulo de medición #40, un módulo de almacenamiento #30, un módulo de comparación #80, y un módulo de salida #110. Los módulos funcionales se pueden ejecutar en una, o múltiples, computadoras, o usando una o múltiples, redes informáticas. El módulo de medición tiene instrucciones informáticas ejecutables para proporcionar, por ejemplo, información de la expresión, en soporte informático legible.

El módulo de medición #40, puede comprender cualquier sistema de detección de una señal que representa el nivel de expresión de los auto-anticuerpos anti-PLA2R . Tales sistemas pueden incluir microarreglos de ADN, matrices de expresión de ARN, cualquier sistema de detección ELISA y/o cualquier sistema de detección de inmunoelectrotransferencia.

La información determinada en el sistema de determinación se puede leer en el módulo de almacenamiento #30. Como se usa en la presente descripción, el "módulo de almacenamiento" se pretende que incluya cualquier aparato de cálculo o procesamiento adecuado u otro dispositivo configurado o adaptado para el almacenamiento de datos o información. Ejemplos de aparatos electrónicos adecuados para su uso con la presente invención incluyen el aparato independiente de soporte informático, datos de redes de telecomunicaciones, incluyendo las redes de área local (LAN), redes de área amplia (WAN), Internet, Intranet, Extranet y local, y los sistemas de procesamiento informático distribuidos. Los módulos de almacenamiento incluyen también, pero no se limitan a: medios de almacenamiento magnéticos, tales como disquetes, medios de almacenamiento de disco duro, cinta magnética, medios de almacenamiento óptico tales como CD-ROM, DVD, medios de almacenamiento electrónicos tales como RAM, ROM, EPROM, EEPROM y similares, discos duros generales e híbridos de estas categorías tales como medios de almacenamiento magnético/óptico. El módulo de almacenamiento se adapta o configura para tener grabado en el mismo la información del nivel de expresión o nivel de proteína. Tal información se puede proporcionar en forma digital que se puede transmitir y leer electrónicamente, por ejemplo, a través de Internet, en disquete, a través de USB (bus universal en serie) o a través de cualquier otra forma adecuada de comunicación.

Como se usa en la presente descripción, "almacenado" se refiere a un proceso para codificar información en el módulo de almacenamiento. Aquellos con experiencia en la técnica pueden adoptar fácilmente cualquiera de los métodos actualmente conocidos para grabar la información en los medios conocidos que generan fabricaciones que comprenden el nivel de expresión de la información.

En un ejemplo, los datos de referencia almacenados en el módulo de almacenamiento que se leen por el módulo de comparación es, por ejemplo, los datos de expresión obtenidos a partir de una población de sujetos no-MN, una población de sujetos MN o datos de expresión obtenidos a partir del mismo sujeto en un punto de tiempo previo usando el módulo de medición #40.

El "módulo de comparación" #80 puede usar una variedad de programas y formatos informáticos disponibles para el operativo de comparación que compara los datos de expresión determinados en el módulo de medición para las muestras de referencia y/o datos de referencia almacenados. En un ejemplo, el módulo de comparación se configura para usar las técnicas de reconocimiento del patrón para comparar información de una o más entradas en uno o más datos de patrones de referencia. El módulo de comparación se puede configurar usando el programa disponible en el mercado o libremente disponible existente para la comparación de patrones, y puede optimizarse para las comparaciones de datos particulares que se realizan. El módulo de comparación proporciona información legible informática relacionada con el nivel de expresión normalizada de auto-anticuerpos, presencia/ausencia de MN en un individuo, eficacia del tratamiento en un individuo, y/o método para tratar un individuo.

El módulo de comparación, o cualquier otro módulo del sistema, pueden incluir un sistema operativo (por ejemplo, UNIX) en el que se ejecuta un sistema de gestión de base de datos relacional, una aplicación de World Wide Web, y un servidor de World Wide Web. La aplicación de World Wide Web incluye el código ejecutable necesario para la

5 generación de declaraciones de bases de datos de lenguajes (por ejemplo, declaraciones de lenguaje de consulta estructurado (SQL)). Generalmente, los ejecutables incluirán declaraciones SQL incorporadas. Adicionalmente, la aplicación de la World Wide Web puede incluir un archivo de configuración que contiene cursores y direcciones a las diversas entidades de programas que comprenden el servidor, así como las diversas bases de datos externas e internas que se pueden acceder para dar servicio a las solicitudes del usuario. El archivo de configuración dirige también las solicitudes de recursos del servidor al hardware adecuado que pueda ser necesario si el servidor se distribuye en dos o más computadoras independientes. En una modalidad, el servidor de la World Wide Web es compatible con el protocolo TCP/ IP. Las redes locales tal como esta se refieren a veces como "Intranets." Una ventaja de tales Intranets es que permiten una fácil comunicación con las bases de datos de dominio público que residen en la World Wide Web (por ejemplo, el sitio World Wide Web del GenBank o Swiss Pro). Así, en una aplicación preferida particular, los usuarios pueden acceder directamente a los datos (por ejemplo a través de vínculos de hipertexto) que residen en las bases de datos de Internet que usan una interfaz HTML proporcionada por los navegadores Web y servidores Web.

15 El módulo de comparación proporciona un resultado de la comparación informática legible que se puede procesar en formato informático legible por criterios predefinidos, o criterios definidos por el usuario, para proporcionar un resultado de la comparación basado en el contenido que se puede almacenar y dar salida conforme a lo solicitado por un usuario mediante un módulo de salida #110.

20 El contenido basado en el resultado de la comparación, puede ser un valor de la expresión en comparación con una referencia que muestra la presencia/ausencia de MN en un individuo o un riesgo evaluado de un sujeto para desarrollar MN.

25 En una aplicación, se muestra el contenido basado en el resultado de la comparación en un monitor de computadora #120. En una aplicación, se muestra el contenido basado en el resultado de la comparación a través de medios de impresión #130, #140. El módulo de visualización puede ser cualquier dispositivo adecuado configurado para recibir desde una computadora y visualizar la información legible computarizada a un usuario. Los ejemplos no limitantes incluyen, por ejemplo, computadoras de uso general, tales como las basadas en el procesador de tipo Intel PENTIUM, procesadores Motorola PowerPC, Sun UltraSPARC, Hewlett-Packard PA-RISC, cualquiera de una variedad de procesadores disponibles de Advanced Micro Devices (AMD) de Sunnyvale, California, o cualquier otro tipo de procesador, dispositivos de visualización tales como pantallas planas, tubos de rayos catódicos y similares, así como impresoras de computadora de varios tipos.

35 En un ejemplo, un navegador de World Wide Web se usa para proporcionar una interfaz de usuario para la visualización del contenido basado en el resultado de la comparación. Debe entenderse que otros módulos de la invención se pueden adaptar para tener una interfaz de navegador web. A través del navegador Web, un usuario puede construir las solicitudes para la recuperación de datos desde el módulo de comparación. Así, el usuario podrá típicamente apuntar y hacer clic en los elementos de la interfaz de usuario, tales como botones, menús desplegables, barras de desplazamiento y similares convencionalmente empleado en las interfaces gráficas de usuario.

40 Por lo tanto, la presente invención se refiere a sistemas (y los medios informáticos legibles para hacer los sistemas informáticos) que realizan los métodos para el diagnóstico o evalúan el pronóstico del tratamiento de MN en un individuo.

45 Los sistemas y medios informáticos legibles descritos en la presente son meramente ilustrativos para la detección de autoanticuerpos anti-PLA2R en un individuo. Las variaciones de los sistemas y medios informáticos legibles descritos en la presente son posibles.

50 Los módulos de la máquina, o los usados en el medio informático legible, pueden asumir numerosas configuraciones. Por ejemplo, la función se puede proporcionar en una sola máquina o distribuirse a través de múltiples máquinas.

*Recolección y preparación de la muestra*

Las colecciones de muestras se pueden realizar por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica

55 Por ejemplo, la sangre del paciente se puede extraer por personal médico capacitado directamente en los anticoagulantes tales como citrato y EDTA. La sangre se puede separar en la porción de plasma, las células, y la porción de plaquetas mediante centrifugación refrigerada a 3500 XG durante 2 minutos. Después de la centrifugación, el sobrenadante es el plasma.

60 Alternativamente, el suero se puede recolectar a partir de la sangre entera. Recolectar la sangre en un plástico duro o tubo de vidrio; la sangre no se coagulará en plástico blando. Extraer 15 mL de sangre total para 6 ml de suero. La sangre completa se deja en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos a 2 horas hasta que ha formado un coágulo. El coágulo se separa cuidadosamente de los lados del recipiente usando una varilla de vidrio o palillo aplicador

de madera y se deja toda la noche a 4°C. Después de lo cual, el suero se decanta, centrifuga, y/o usando una pipeta Pasteur, se saca el suero a un tubo limpio. Clarificar el suero por centrifugación a 2000-3000 rpm durante 10 minutos. El suero se almacena a -20° o -80°C antes de que se lleve a cabo el análisis de autoanticuerpos contra PLA2R. La descripción detallada de la obtención de suero usando tubos de recolección se puede encontrar en la patente de Estados Unidos núm. 3,837,376. Los tubos de recolección de sangre se pueden adquirir además de BD Diagnostic Systems, Greiner Bio-One, y Kendall Company.

*Detección de anticuerpos de PLA2R*

La detección de autoanticuerpos contra PLA2R humano o porcino en la sangre, suero o plasma se puede detectar por cualquier método conocido en la técnica. Preferentemente por ELISA, en donde el método de detección es un método inmunoquímico que implica la unión de los auto-anticuerpos con una proteína PLA2R o fragmentos de la misma. La formación del complejo de proteína-anticuerpo se detecta entonces mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica.

El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, también llamado ELISA, ensayo inmunoenzimático o EIA, es una técnica bioquímica usada principalmente en la inmunología para detectar la presencia de un anticuerpo o un antígeno en una muestra. El ELISA se usó como una herramienta de diagnóstico en medicina y patología de planta, así como un control de calidad en diversas industrias. Para los métodos descritos en la presente, en el ELISA una cantidad conocida de antígeno (PLA2R o fragmentos de la misma) se fija a una superficie, y luego la muestra, por ejemplo sangre, suero o plasma, sospechosa de contener autoanticuerpos a PLA2R, se lava sobre la superficie de manera que los autoanticuerpos pueden unirse al antígeno inmovilizado. La superficie se lava para eliminar cualquier proteína no unida y un anticuerpo de detección se aplica a la superficie. El anticuerpo de detección es específico a los anticuerpos del sujeto. Por ejemplo, si el sujeto es un humano, el anticuerpo de detección debe ser un anticuerpo anti-IgG humano. Si el sujeto es un perro, el anticuerpo de detección debe ser entonces un anticuerpo anti-IgG de perro. Este anticuerpo de detección se une a una enzima, y en la etapa final se añade una sustancia que la enzima puede convertir en alguna señal detectable. Por ejemplo, en el caso del ELISA de fluorescencia, cuando la luz se brilla sobre la muestra, cualquiera de los complejos antígeno/anticuerpo se verá fluorescente tal que se puede medir la cantidad de anticuerpos en la muestra. Este es el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima indirecto. Un diagrama esquemático del ELISA indirecto se muestra en la Fig. 7.

El siguiente es un protocolo general estándar para la creación y realización de un ensayo inmunoenzimático indirecto. El uso de placas de microtitulación de 96 pocillos (placa Falcon Pro-Bindassay 3915; Becton Dickinson, Paramus, Nueva Jersey), los pocillos de prueba se recubren con el antígeno (PLA2R o fragmentos de la misma) por incubación con 100 µl de PLA2R purificada (3 µg/ml en PBS) por pocillo durante la noche a temperatura ambiente, con PBS sustituido por el antígeno en los pocillos de control. Después de que las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween, 250 µl de BSA al 2% en PBS se añadieron a cada pocillo, y las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavan tres veces con PBS-Tween y se incuban durante 1 h a temperatura ambiente con sueros de prueba y sueros de control (una muestra de suero muy positiva, dos muestras de suero negativas, y una muestra de suero débil-positiva) diluidas 1:100 en PBS-Tween-BSA; cada muestra de suero se prueba por triplicado en pocillos recubiertos con el antígeno, así como en los pocillos de control del antígeno. La placa se ensaya después (con controles adecuados) para la presencia de auto-anticuerpos IgG humano contra PLA2R mediante incubación durante 1 h a temperatura ambiente con 100 µl de anti-IgG humana en carnero conjugado con peroxidasa de rábano picante (Bio-Rad, Richmond, Calif.) por pocillo diluido 1:2,000 en PBS-Tween-BSA. Después de tres lavados en PBS-Tween, se añade a cada pocillo la solución de sustrato (diclorhidrato de o-fenilendiamina; Sigma). Las placas se incuban después durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad, y la reacción se termina mediante la adición de ácido sulfúrico 2N. Los valores de densidad óptica a 490 nm (DO<sub>490</sub>) se miden en un lector de micro placa de ELISA. Para cada muestra de suero, lecturas media de DO<sub>490</sub> se calculan para los pocillos de prueba y para los pocillos de control del antígeno, el último que se resta del anterior para obtener el valor neto del ELISA.

La realización de una ELISA implica al menos un anticuerpo con especificidad para un antígeno particular. Una cantidad conocida de antígeno (PLA2R) se inmoviliza sobre un soporte sólido (por lo general una placa de micro titulación de poliestireno), ya sea de forma no específica (a través de la adsorción a la superficie) o específicamente (a través de la captura por otro anticuerpo específico para el mismo antígeno, en un ELISA "sandwich"). Después de que se inmoviliza el antígeno, se añade el anticuerpo de detección, formando un complejo con el antígeno. El anticuerpo de detección puede unirse covalentemente a una enzima, o se puede detectar en sí por un anticuerpo secundario que se enlaza a una enzima a través de bio-conjugación. Entre cada etapa la placa se lava típicamente con una solución de detergente suave para eliminar cualquier proteína o anticuerpos que no están unidos específicamente. Después de la etapa de lavado final, la placa se desarrolla mediante la adición de un sustrato enzimático para producir una señal visible, que indica la cantidad de antígeno en la muestra. Los ELISA más viejos utilizan sustratos cromogénicos, aunque los nuevos ensayos emplean sustratos fluorogénicos con una sensibilidad mucho mayor.

En otra modalidad, se usa un ELISA competitivo. Los anticuerpos anti-PLA2R purificados que no se derivan del sujeto

se recubren en la fase sólida de múltiples pocillos. El PLA2R recombinado de la muestra de suero, (el antígeno) o fragmentos de este y peroxidasa de rábano picante marcada con anticuerpos anti-PLA2R (conjugado) se añaden a los pocillos recubiertos, y forman la combinación competitiva. Después de la incubación, si el nivel de auto-anticuerpo contra el contenido de PLA2R es alto en la muestra, se formará un complejo de PLA2R- auto-anticuerpos anti-PLA2R marcado con HRP. El lavado de los pocillos eliminará el complejo, y se incubará con sustrato de revelado de color TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzideno) para la localización de los anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano picante en los pocillos. Posteriormente no existirá cambio de color o poco cambio de color. Si no existen auto-anticuerpos contra PLA2R en la muestra de suero, habrá mucho cambio de color. Un prueba ELISA competitiva de ese tipo es específica, sensible, reproducible y fácil de operar.

En una modalidad, se usa ELISA sándwich inverso (RS) (Miyazawa H., y otros, J Allergy Clin Immunol. 1988; 82:407-413), en donde el anticuerpo de interés, en los métodos descritos en la presente descripción, los auto-anticuerpos contra PLA2R, se atrapa por antígenos (PLA2R): un antígeno se fija a una superficie y el segundo antígeno es soluble y se etiqueta. Este método se conoce también como el método sandwich de doble antígeno. Un diagrama esquemático de ELISA RS se muestra en la Figura 7.

El siguiente es un protocolo estándar general para el establecimiento y la realización de un RS-ELISA. Una cantidad de 0.1 ml de PLA2R (0.3 µg/ml) o PLA2R (0.9 µg/ml) más albúmina de suero bovino (BSA; 25 µg/ml) en 0.5 M de NaCl-0.1% de NaN<sub>3</sub>-0.05 M de carbonato de sodio (pH 9.6) se añade a los pocillos de microplacas Maxisorp (Nunc Nalge, Copenhagen, Dinamarca). Las placas se incuban durante toda la noche a 4 °C para la inmovilización del antígeno. Después de que se lavan los pocillos los sueros de prueba diluidos 1:4, 1:40 y 1:400 con FBS-SAFT (10% [vol/vol] de suero fetal bovino [FBS], 0.1% de NaN<sub>3</sub>-solución salina regulada con fosfato [PBS]-0.05% de Tween 20 [PBST]) se añaden, y las placas se incuban durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se usan siete diluciones en serie triples del suero de referencia. Después de otro lavado, PLA2R biotinilado o PLA2R (0.05 µg/ml) en FBS-PBST se añade después a los pocillos, y se permite que la reacción tenga lugar durante 60 min a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan de nuevo, β-D-galactosidasa conjugada con estreptavidina (GIBCO BRL, Life Technologies Inc., Rockville, Md.; diluida 1:50,000 en PBST que contiene 1% de BSA) se añade, y las placas se incuban durante 60 min a temperatura ambiente. Después de otro lavado, se añade 0.2 mM de 4-metilumbeliferil-β-D-galactósido (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) en 0.1 M de NaCl-1 mM de MgCl<sub>2</sub>-0.1% de BSA-0.1% de NaN<sub>3</sub>-0.01 de M fosfato sódico (pH 7.0). Los pocillos se sellan con cinta, y las placas se sumergen en agua a 37°C durante 60 min. Por último, 0.1 ml de 0.1 M de glicina-NaOH (pH 10.2) se añade a cada pocillo para detener la reacción enzimática. Las unidades de fluorescencia (FU) en cada pocillo se mide con un aparato Fluoroskan II (Flow Laboratories, Rockville, Md.). Las concentraciones de anticuerpos de los sueros de prueba se calculan a partir de la curva de titulación del suero de referencia con unidades de anticuerpo conocido por mililitro.

En una modalidad preferida, el anticuerpo de detección se marca de manera detectable por el enlazamiento del anticuerpo a una enzima. La enzima, a su vez, cuando se expone a su sustrato, reaccionará con el sustrato de tal modo como para producir una porción química que se pueda detectar, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Las enzimas que se pueden usar para marcar de forma detectable los anticuerpos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, malato deshidrogenasa, nucleasa de estafilococos, delta-V-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-VI-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa.

En otras modalidades, el anticuerpo de detección se marca con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado fluorescentemente se expone a luz de la longitud de onda adecuada, su presencia se puede detectar después debido a la fluorescencia. Entre los compuestos marcadores fluorescentes más comúnmente usados están los tintes CY, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina.

Un anticuerpo de detección también puede marcarse detectablemente por medio del uso de metales emisores de fluorescencia tales como <sup>152</sup>Eu, u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales pueden unirse al anticuerpo usando tales grupos quelantes de metales como ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Un anticuerpo de detección también puede marcarse detectablemente por acoplamiento a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo quimioluminiscente se determina después detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química. Los ejemplos de compuestos marcadores quimioluminiscentes particularmente útiles son luminol, luciferina, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

Existen otras formas diferentes de ELISA, que son bien conocidos por aquellos con experiencia en la técnica. Las técnicas estándar conocidas en la técnica para ELISA se describen en "Methods in Immunodiagnosis", 2da Edición,

Rose y Bigazzi, eds. John Wiley & Sons, 1980; Campbell y otros, "Methods and Immunology", W. A. Benjamin, Inc., 1964; y Oellerich, M. 1984, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22:895-904.

5 Otras técnicas se pueden usar para detectar auto-anticuerpos PLA2R en una muestra. Una de tales técnicas es la transferencia Western (Towbin y otros, Proc. Nat. Acad. Sci. 76:4350 (1979)), otra es una adaptación de la Membrana de Western, las membranas de transferencia puntual. En las Membranas de Western, la proteína PLA2R o fragmentos de esta puede disociarse con detergentes y calor, y se corre en un gel de SDS-PAGE antes de que se transfiera a un soporte sólido, tal como un filtro de nitrocelulosa. El filtro se lava con una muestra sospechosa de contener auto-anticuerpos contra PLA2R. El filtro se lava después para eliminar las proteínas no unidas y las proteínas con unión no específica. Los anticuerpos secundarios enlazados a enzimas marcadas detectablemente se pueden usar después para detectar y evaluar la cantidad de auto-anticuerpos en la muestra ensayada. La intensidad de la señal de la etiqueta detectable corresponde a la cantidad de enzima presente, y por lo tanto la cantidad de auto-anticuerpos contra PLA2R. Los niveles pueden cuantificarse, por ejemplo por densitometría.

15 Otro ensayo inmunológico es inmunoensayos nefelométricas. Inmunoensayos nefelométricas son conocidos por un experto en la técnica y se pueden realizar con los métodos como se describe en las patentes de Estados Unidos núms. 4730922,4268171, 4401387, 4408880, 4889815, 4690906, 4784947, y 516223.

20 Como control positivo de anticuerpos contra PLA2R, se puede usar una cantidad conocida de anticuerpos anti-PLA2R. Los anticuerpos anti-PLA2R se pueden obtener de fuentes comerciales tales como INVITROGEN Inc., MILLIPORE, SIGMA-ALDRICH, R&D Systems, ABCAM y el World's Antibody Gateway (motor de búsqueda libre de más de 150 empresas de anticuerpos) y algunos pocos nombre GeneText. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales. Alternativamente, pueden producirse anticuerpos contra la proteína PLA2R humana (GENBANK™ núm. de acceso NP\_001007268; sec. con núm. de ident. 1 y NP\_031392.3, sec. con núm. de ident. 2) o fragmentos de esta por un experto en la técnica. Los métodos para la producción de anticuerpos se describen en PCT publicación WO 97/40072 o Solicitud de Estados Unidos núm. 2002 /0182702. Los procesos de inmunización para provocar la producción de anticuerpos en un mamífero, la generación de hibridomas para producir anticuerpos monoclonales, y la purificación de anticuerpos se pueden realizar por describe en "Current Protocols in Immunology" (CPI) (John Wiley and Sons, Inc.) y Antibodies: A Laboratory Manual (editores Ed Harlow y David Lane , Cold Spring Harbor Laboratory Press 1988).

35 La detección de autoanticuerpos contra PLA2R se considera positivo cuando la señal del inmunoensayo es al menos 10% sobre la señal del inmunoensayo control en ausencia de un anticuerpo contra el PLA2R o fragmentos de este o en presencia de un anticuerpo de unión no-relacionado, no-PLA2R. En otra modalidad, la señal del inmunoensayo control es esa obtenida con el suero de los sujetos sanos no-MN, estos sujetos no tienen las características clínicas de la enfermedad. En otra modalidad, la señal del inmunoensayo control es el valor medio obtenido de una población de sujetos sanos no-MN. Una población es al menos 25 sujetos sanos no-MN, preferentemente más. El incremento es al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 50%, al menos 100%, al menos 200%, al menos 300%, al menos 500%, al menos 1000%, o más e incluye todos los porcentajes entre 10-1000%.

40 En una modalidad, la detección de auto-anticuerpos comprende identificar y detectar la cantidad elevada de la ARNm que codifica para los anticuerpos. Existen muchos métodos para detectar, identificar y determinar ARNm que son bien conocidos en la técnica, por ejemplo. Transferencias Northern y RT-PCR. En una modalidad, el ARNm se puede determinar por PCR cuantitativo en tiempo real. PCR en tiempo real es una técnica de amplificación que se puede usar para determinar los niveles de expresión del ARNm. (Ver, por ejemplo, Gibson y otros, Genome Research 6:995-1001, 1996; Heid y otros, Genome Research 6:986-994, 1996). El PCR en tiempo real evalúa el nivel de acumulación de producto de PCR durante la amplificación. Esta técnica permite la evaluación cuantitativa de los niveles de ARNm en múltiples muestras. Para los niveles de ARNm, el ARNm se extrae de una muestra biológica, por ejemplo, una muestra de sangre, y el ADNc se prepara usando técnicas estándar. El PCR en tiempo real se puede realizar, por ejemplo, usando un instrumento Perkin Elmer/Applied Biosystems (Foster City, Calif.) 7700 Prism. Los cebadores coincidentes y las sondas fluorescentes se pueden diseñar para genes de interés usando, por ejemplo, el programa de cebador expreso proporcionado por Perkin Elmer/Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Las concentraciones óptimas de cebadores y sondas se pueden determinar inicialmente por aquellos con experiencia en la técnica, y el control (por ejemplo, beta-actina) cebadores y sondas se pueden obtener comercialmente de, por ejemplo Perkin Elmer/Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Para cuantificar la cantidad del ácido nucleico de interés específico en una muestra, una curva estándar se genera usando un control. Las curvas estándar se pueden generar usando los valores de Ct determinados en la PCR en tiempo real, que se relacionan con la concentración inicial del ácido nucleico de interés usado en el ensayo. Diluciones estándar que van desde 10-106 copias del gen de interés son generalmente suficientes. Adicionalmente, una curva estándar se genera para la secuencia de control. Esto permite la estandarización del contenido inicial del ácido nucleico de interés en una muestra de tejido con la cantidad de control para propósitos de comparación.

Los métodos de PCR cuantitativo en tiempo real usando sondas TaqMan son bien conocidos en la técnica. Los

protocolos detallados para PCR cuantitativo en tiempo real se proporcionan, por ejemplo, para ARN en: Gibson y otros, 1996, *Genome Res.*, 10:995-1001; y para ADN en: Heid y otros, 1996, *Genome Res.*, 10:986-994.

Los ensayos basados en TaqMan usan una sonda de oligonucleótido fluorogénico que contiene colorante fluorescente 5' y un agente de desactivación 3'. La sonda se hibrida a un producto de PCR, pero no puede en sí mismo ser extendido debido a un agente de bloqueo en el extremo 3'. Cuando el producto de la PCR se amplifica en ciclos posteriores, la actividad nucleasa 5' de la polimerasa, por ejemplo, AmpliTaq, resulta en la escisión de la sonda TaqMan. Esta escisión separa el colorante fluorescente 5' y el agente de desactivación 3' resultando de ese modo en un aumento en la fluorescencia como una función de la amplificación (Ver, por ejemplo, en el Perkin Elmer World Wide Web).

En otra modalidad, la detección de transcritos de ARN se pueden lograr mediante transferencia (de tipo) Northern, en donde una preparación de ARN se corre en un gel de agarosa desnaturalizante, y se transfiere a un soporte adecuado, tal como celulosa, nitrocelulosa o membranas de vidrio o de nailon activadas. EL ADNc o ARN marcado (por ejemplo, radiomarcado) se hibrida después con la preparación, se lava y se analiza por métodos tales como autorradiografía.

En otra modalidad, la detección de transcritos de ARN se puede lograr además usando métodos de amplificación conocidos. Por ejemplo, está dentro del alcance de la presente invención reverso transcribir ARNm en ADNc seguido por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR); o, usar una sola enzima para ambas etapas como se describe en la patente de Estados Unidos núm. 5,322,770, o reverso transcribir ARNm en ADNc seguido por reacción en cadena de la lipasa con interrupción simétrica (RT-AGLCR) como se describe por R. L. Marshall, y otros, *PCR Methods and Applications* 4: 80-84 (1994). Un método adecuado para detectar transcritos de ARNm de la enzima se describe como referencia Pabic y otros *Hepatology*, 37(5): 1056-1066, 2003.

En otras modalidades, la detección de los transcritos de ARN se puede lograr con otros métodos de amplificación conocidos que incluyen pero no se limitan a la llamada técnica "NASBA" o "3SR" descrita en *PNAS USA* 87: 1874-1878 (1990) y también descrita en *Nature* 350: 91-92 (1991); amplificación Q-beta como se describe en la Solicitud de Patente Europea publicada (EPA) núm. 4544610; amplificación por desplazamiento de cadena, (como se describe en G. T. Walker y otros, *Clin. Chem.* 42: 9-13 (1996) y Solicitud de Patente Europea núm. 684315; y amplificación mediada por el objetivo, como se describe por Publicación PCT WO 9322461.

Se abarca en el método descrito en la presente descripción emplear la visualización de la hibridación *in situ* para la detección de auto-anticuerpos para los transcritos ARN de PLA2R en muestras de sangre. En la hibridación *in situ*, una sonda de ARN antisentido marcado radiactivamente se hibrida con un frotis fino de plaquetas, después de lo cual se lava el frotis fino de plaquetas, escinde con RNasa, y expone a una emulsión sensible para la autorradiografía. Las muestras se pueden teñir con hematoxilina para demostrar la composición histológica de la muestra, y la imagen de campo oscuro con un filtro de luz adecuado muestra la emulsión desarrollada. Se pueden usar también marcadores no radiactivos tales como digoxigenina.

Alternativamente, la expresión del ARNm se puede detectar en una matriz ADN, chip o una micromatriz. Los oligonucleótidos correspondientes a auto-anticuerpos para transcritos ARN de PLA2R se inmovilizan en un chip que se hibrida después con los ácidos nucleicos marcados de una muestra de plaquetas obtenido a partir de un paciente. La señal de hibridación positiva se obtiene con una muestra que contiene auto-anticuerpos para los transcritos ARN de PLA2R. Los métodos para preparar las matrices de ADN y su uso son bien conocidos en la técnica. (Ver, por ejemplo patentes de Estados Unidos núms. 6,618,679; 6,379,897; 6,664,377; 6,451,536; 548,257; U.S. 20030157485 y Schena y otros 1995 *Science* 20:467-470; Gerhold y otros 1999 *Trends in Biochem. Sci.* 24, 168-173; y Lennon y otros 2000 *Drug discovery Today* 5: 59-65). El análisis en serie de la Expresión Génica (SAGE) también se puede realizar (Ver, por ejemplo solicitud de patente de los Estados Unidos 20030215858).

Para controlar los niveles de ARNm, por ejemplo, el ARNm se extrae de la muestra de sangre que se prueba, reverso transcribe, y se generan las sondas de ADNc marcado con fluorescencia. Los microarreglos capaces de hibridarse con ADNc se prueban después con las sondas de ADNc marcadas, las diapositivas se escanean y se mide la intensidad de fluorescencia. Esta intensidad se correlaciona con la intensidad de hibridación y los niveles de expresión. Los ADNc corresponden con los auto-anticuerpos para los transcritos ARN de PLA2R, particularmente en la región variable del anticuerpo.

Métodos de amplificación "cuantitativa" son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, PCR cuantitativo implica co-amplificar simultáneamente una cantidad conocida de una secuencia de control usando los mismos cebadores. Esto proporciona un estándar interno que se puede usar para calibrar la reacción de PCR. Se proporcionan protocolos detallados para PCR cuantitativo, por ejemplo, en Innis y otros (1990) *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. N.Y.

*Vectores de expresión de proteína PLA2R recombinante y PLA2R*

La proteína recombinante PLA2R y fragmentos de esta también se pueden sintetizar y purificar por métodos moleculares que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las proteínas recombinantes se puede expresar en bacterias, mamíferos, insectos, levaduras, o células vegetales.

5 Las técnicas convencionales de clonación reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se pueden usar para clonar un ácido nucleico que codifica un PLA2R, usando el ARNm del PLA2R como el molde para la Clonación por PCR. En algunas modalidades, los moldes ARNm de PLA2R humano son los números de acceso de Genbank NM\_001007267, sec. con núm. de ident. 3 y NM\_007366.3, sec. con núm. de ident. 4 . Idealmente, los sitios de reconocimiento de la digestión con la enzima de restricción se deben diseñar en los extremos de la cadena sentido y anti-sentido de los cebadores de PCR para facilitar la ligación del ácido nucleico amplificado en un vector de clonación u otros vectores. Alternativamente, un saliente 3'-A se puede incluir para el propósito de clonación TA que es bien conocido en la técnica. Tales ácidos nucleicos de codificación con saliente 3'-A se puede fácilmente ligar en los vectores TA asistidos con topoisomerasa de Invitrogen tales como pCR<sup>®</sup>-TOPO, pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO, pENTR/D-TOPO<sup>®</sup>, y pENTR/SD/ID-TOPO<sup>®</sup>. El ácido nucleico codificante se puede clonar en un vector de clonación de propósito general tales como los vectores pUC 19, pBR322, pBLUESCRIPT (STRATAGENE Inc.) o pCR TOPO<sup>®</sup> de Invitrogen Inc. El vector recombinante resultante que porta el ácido nucleico que codifica un PLA2R puede subclonarse después en vectores de expresión de proteínas o vectores virales para la síntesis de proteína de fusión PLA2R en una variedad de sistemas de expresión de proteínas usando células huésped seleccionadas del grupo que consiste de líneas celulares de mamífero, líneas celulares de insecto, levadura, bacteria y células de plantas. Los sitios de escisión de proteasa se pueden diseñar e incluir también dentro del ácido nucleico para facilitar la liberación de PLA2R de una proteína de fusión mayor, por ejemplo His-PLA2R o tiorredoxina-PLA2R. Ejemplos de sitios de escisión de proteasa incluyen, pero no se limitan a enteroquinasa, quimotripsina, y trombina.

25 Los ácidos nucleicos que codifican amplificados por PCR se pueden clonar en un vector usando el método de clonación TOPO<sup>®</sup> en vectores TA asistidos con topoisomerasa de Invitrogen tales como pCR<sup>®</sup>-TOPO, pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO, pENTR/D-TOPO<sup>®</sup>, y pENTR/SD/D-TOPO<sup>®</sup>. Tanto pENTR/D-TOPO<sup>®</sup>, como pENTR/SD/D-TOPO<sup>®</sup> son los vectores de entrada TOPO direccionales que permiten la clonación de la secuencia de ADN en la orientación 5'→3' en un vector de expresión GATEWAY<sup>®</sup>. La clonación direccional en la orientación 5'→3' facilita la inserción unidireccional de la secuencia de ADN en un vector de expresión de la proteína de tal manera que el promotor está corriente arriba del codón de inicio 5' ATG del ácido nucleico, permitiendo así la expresión de la proteína impulsada por el promotor. El vector recombinante que porta un ácido nucleico codificante PLA2R se puede transfectar en y propagar en unas células *E. coli* de clonación general tales como células XL1Blue, SURE (STRATAGENE) y TOP-10 (INVITROGEN).

35 Diferentes vectores de expresión están disponibles para la expresión y purificación de una proteína recombinante producida se puede hacer a partir de un sistema de expresión de la proteína heteróloga. Los sistemas de expresión de proteínas heterólogas que usan células huésped seleccionadas de, por ejemplo, mamífero, insecto, levadura, bacteriana, o células de planta son bien conocidos por aquellos con experiencia en la técnica. El vector de expresión debe tener los elementos reguladores necesarios 5' corriente arriba y 3' corriente abajo tales como secuencias promotoras, reconocimiento de ribosomas y unión de la caja TATA, y 3' UTR AAUAAA (sec. ident. núm. 5) secuencia de terminación de la transcripción para la transcripción génica eficiente y traducción en su respectiva célula huésped. El vector de expresión puede tener secuencia adicional tal como 6X-histidina, V5, tiorredoxina, glutatión-S-transferasa, c-Myc, VSV-G, HSV, FLAG, péptido de unión a maltosa, péptido de unión a metal, HA y las señales de "secreción" (melitina de la abeja,  $\alpha$ -factor, PHO, Bip), que se incorpora en la proteína recombinante expresada. Adicionalmente, pueden haber sitios de digestión con enzimas incorporados después de estas secuencias que facilitan la eliminación enzimática o secuencia adicional después de que no son necesarias. Estas secuencias adicionales son útiles para la detección de la expresión de proteína recombinante, para la purificación de proteína mediante cromatografía de afinidad, solubilidad aumentada de la proteína recombinante en el citoplasma del huésped, para la mejor expresión de la proteína especialmente para pequeños fragmentos de proteínas y/o para secretar la proteína recombinante expresada fuera al medio de cultivo, en el periplasma de las bacteria procariota, o para el esferoplasto de células de levadura. La expresión de la proteína recombinante puede ser constitutiva en las células huésped o puede ser inducido, por ejemplo, con sulfato de cobre, azúcares tales como galactosa, metanol, metilamina, tiamina, tetraciclina, infección con baculovirus, e (isopropilo-beta-D-tiogalactopiranosido) IPTG, un análogo sintético estable de lactosa.

55 En algunas modalidades, PLA2R recombinante se puede expresar en una variedad de células huésped de expresión por ejemplo, bacterias, tales como células de *E. coli*, levadura, mamífero, insecto, y planta tales como *Chlamydomonas*, o aun de sistemas de expresión libre de células. A partir de un vector de clonación, el ácido nucleico se puede subclonar en un vector de expresión recombinante que es apropiado para la expresión de la proteína en célula de mamífero, insecto, levadura, o planta, o un sistema de expresión libre de célula, tal como un sistema de expresión de reticulocito de conejo. La subclonación se puede lograr mediante clonación por PCR, digestión de restricción seguido por ligación, o reacción de recombinación tales como la recombinación específica de sitio basada en fagos lambda usando las mezclas de enzimas Gateway<sup>®</sup> LR y BP CLONASE<sup>™</sup>. La subclonación debe ser unidireccional de manera que el codón de inicio 5' ATG del ácido nucleico está corriente abajo del promotor en el vector de expresión. Alternativamente, cuando se clona el ácido nucleico codificante en pENTR/D-TOPO<sup>®</sup>, pENTR/SD/D-TOPO<sup>®</sup> (vectores de entrada direccional), o

cualquiera de los vectores Gateway<sup>®</sup> de Invitrogen Technology pENTR (entrada), el ácido nucleico codificante se puede transferir en varios vectores de expresión GATEWAY<sup>®</sup> (destino) para la expresión de proteína en células de mamíferos, *E. coli*, insectos y levadura respectivamente en una reacción de recombinación única. Algunos de los vectores de destino GATEWAY<sup>®</sup> se diseñan para las construcciones de baculovirus, adenovirus, virus adeno-asociado (AAV), retrovirus, y lentivirus, que al infectar a su respectiva célula huésped, permiten la expresión heteróloga de la proteína recombinante en las células huésped. Transferir un gen en un vector de destino se lleva a cabo en tan sólo dos etapas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Existen vectores de expresión GATEWAY<sup>®</sup> para la expresión de proteína en *E. coli*, células de insecto, células de mamífero, y levadura. Después de la transformación y la selección en *E. coli*, el vector de expresión está listo para ser usado para la expresión en el huésped adecuado.

Los ejemplos de otros vectores de expresión y células huésped son los vectores pET (NOVAGEN), vectores pGEX (Amersham Pharmacia), y vectores pMAL (Laboratorios Nueva Inglaterra Inc.) para la expresión de proteína en células huésped *E. coli* tales como BL21, BL21(DE3) y AD494(DE3)pLysS, Rosetta (DE3), y Origami(DE3) (NOVAGEN); el pcDNA3.1 basado en el promotor de CMV (INVITROGEN) y vectores pCIneo (Promega) para la expresión en líneas celulares de mamíferos tales como CHO, COS, HEK-293, Jurkat, y MCF-7; vector de replicación incompetente adenoviral vectores pADENO X, pAd5F35, pLP-ADENO-X-CMV (CLONTECH), pAd/CMV/V5-DEST, vector pAd-DEST (Invitrogen) para la transferencia génica mediada por adenovirus y la expresión en células de mamíferos; vectores de retrovirus pLNCX2, pLXSN, y pLAPSN para uso con el sistema RETRO-X<sup>™</sup> de Clontech para la transferencia génica mediada por retrovirus y la expresión en células de mamífero; pLenti4/V5-DEST<sup>™</sup>, pLenti6/V5-DEST<sup>™</sup>, y pLenti6.2/V5-GW/lacZ (INVITROGEN) para la transferencia génica mediada por lentivirus y expresión en células de mamífero; vectores de expresión de virus asociados a adenovirus, tales como vector pAAV-MCS, pAAV-IRES-hrGFP, y pAAV-RC (Stratagene) para la transferencia génica mediada por adeno-virus asociado y la expresión en células de mamífero; baculovirus BacPAK6 (CLONTECH) y pFASTBAC<sup>™</sup> HT (INVITROGEN) para la expresión en líneas celulares de insecto *Spodopera frugiperda* 9 (Sf9) y Sf11; pMT/BiP/V5-His (INVITROGEN) para la expresión en células S2 de *Drosophilla Schneider*; vectores de expresión de *Pichia* PICZ $\alpha$ , pPICZ, pFLD $\alpha$  y pFLD (Invitrogen) para la expresión en *Pichia pastoris* y vectores pMET $\alpha$  y pMET para la expresión en *P. metanólica*; vectores pYES2/GS y pYD1 (INVITROGEN) para la expresión en levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Recientes avances en la expresión a gran escala de las proteínas heterólogas en *Chlamydomonas reinhardtii* se describen por Griesbeck C. y otros 2006 Mol. Biotechnol. 34:213-33 y Fuhrmann M. 2004, Methods Mol Med. 94:191-5. Las secuencias codificantes heterólogas extrañas se insertan en el genoma del núcleo, cloroplasto y mitocondria por recombinación homóloga. El vector de expresión del cloroplasto p64 que porta el marcador seleccionable de cloroplasto versátil aminoglucósido adenil transferasa (aadA), que confiere resistencia a la espectinomocina o estreptomocina, se puede usar para expresar proteínas extrañas en el cloroplasto. El método biolístico de pistola de genes se puede usar para introducir el vector en las algas. A su entrada en los cloroplastos, el ADN extraño se libera de las partículas de la pistola de genes y se integra en el genoma del cloroplasto a través de recombinación homóloga.

La expresión de la proteína recombinante en las diferentes células huésped puede ser constitutiva o inducible con inductores tales como sulfato de cobre, azúcares tales como galactosa, metanol, metilamina, tiamina, tetraciclina o IPTG. Después de que la proteína se expresa en las células huésped, las células huésped se lisan para liberar la proteína expresada para la purificación. Los métodos para lisar diferentes células huésped se ofrecen en "Sample Preparation-Tools for Protein Research" EMD Bioscience y en Current Protocols in Protein Sciences en Protein Sciences (CPPS). Un método de purificación preferido es la cromatografía de afinidad tal como cromatógrafo de afinidad por iones de metal usando resinas de afinidad de níquel, cobalto o zinc para la proteína recombinante etiquetada con histidina. Los métodos para purificar proteínas recombinantes etiquetadas con histidina se describen por CLONTECH usando su resina de cobalto TALON<sup>®</sup> y por NOVAGEN en su sistema manual pET, 10<sup>a</sup> edición Otra estrategia de purificación preferida es mediante cromatografía de inmunoafinidad, por ejemplo, la resina conjugada anticuerpo anti-myc se puede usar para purificar por afinidad el péptido recombinante con etiqueta myc. La digestión enzimática con serina proteasas tales como trombina y enteroquinasa escinde y libera la proteína recombinante de la etiqueta histidina o myc, liberando la proteína recombinante de la resina de afinidad mientras que las etiquetas histidina y las etiquetas myc se dejan unidas a la resina de afinidad.

Se contemplan también sistemas de expresión sin células. Los sistemas de expresión sin células ofrecen varias ventajas sobre los métodos tradicionales de expresión basados en células, que incluyen la modificación fácil de las condiciones de reacción para favorecer el plegamiento de la proteína, sensibilidad disminuida a la toxicidad e idoneidad del producto para las estrategias de gran productividad, tales como el tamizaje de expresión rápida o gran cantidad de producción de proteínas debido a los volúmenes de reacción reducidos y tiempo de proceso. El sistema de expresión libre de células puede usar ADN de plásmido o lineal. Además, las mejoras en la eficiencia de traducción han resultado en rendimientos que exceden un miligramo de proteína por mililitro de mezcla de reacción. Un ejemplo de un sistema de traducción libre de células capaz de producir proteínas con alto rendimiento se describe por Spirin AS. y otros, Science 242:1162 (1988). El método usa un diseño de flujo continuo del tampón de alimentación que contiene aminoácidos, trifosfato de adenosina (ATP), y trifosfato de guanosina (GTP) a lo largo de la mezcla de reacción y una eliminación continua del producto polipéptido traducido. El sistema usa lisado de *E. coli* para proporcionar el tampón de alimentación continua libre de células. Este sistema de flujo continuo es compatible tanto con vectores de expresión procariotas como

eucariotas. Como un ejemplo, la producción libre de células a gran escala del transportador multifármaco EmrE de la proteína membrana integral se describe por Chang G. y otros, Science 310:1950-3 (2005).

Otros sistemas de expresión libre de células disponibles en el comercio incluyen los Sistemas de Expresión Libre de Células EXPRESSWAY™ (Invitrogen) que utilizan un sistema in-vitro basado en *E. coli* para las reacciones eficientes de traducción y transcripción, acopladas para producir hasta cantidades de miligramo de proteína recombinante activa en un formato de tubo de reacción; el Sistema de Traducción Rápido (RTS) (Roche Applied Science), que también usa un sistema in vitro basado en *E. coli*; y los Sistemas de lisado de reticulocito TNT Acoplado (Promega), que usan un sistema *in-vitro* basado en reticulocito de conejo.

Se abarca en los métodos descritos en la presente descripción un PLA2R de mamífero que se purifica de un mamífero, por ejemplo un cerdo o un conejo. En una modalidad, el PLA2R de mamífero nativo (no recombinante) se purifica de los riñones *ex vivo*. Los métodos de purificación de la proteína nativa son bien conocidos para una persona con experiencia en la técnica.

*Composiciones Terapéuticas/Profilácticas y Administración*

En una modalidad, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un PLA2R o fragmento antigénico de este para uso en el tratamiento de MN idiopática. La composición puede comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede ser una combinación de PLA2R completo y fragmentos de varios tamaños, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de los fragmentos son fragmentos que comprenden los CTLD o CRD 4, 5 6 de PLA2R u otros fragmentos del dominio extracelular de PLA2R. La composición farmacéutica se usa para el tratamiento de MN que se caracteriza por la presencia de auto-anticuerpos contra PLA2R.

En una modalidad, el término "farmacéuticamente aceptable" significa, aprobado para su uso en animales, y más particularmente para el uso en humanos, por una agencia regulatoria del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otras farmacopeas generalmente reconocidas. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el cual es administrado el agente terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites, incluyendo aquellos de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica es administrada por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones de dextrosa y glicerina acuosas se pueden emplear también como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos aceptables incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerina, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerina, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes amortiguadores de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede ser formulada como un supositorio, con aglutinantes tradicionales y portadores tales como los triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándares tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato magnésico, etc. Los ejemplos de los portadores farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18o. Ed., Gennaro, ed. (Mack Publishing Co., 1990). Otros ingredientes se pueden añadir a las formulaciones Farmacéuticas, que incluyen antioxidantes, por ejemplo, ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente diez residuos), por ejemplo, poliarginina o tripéptidos; proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico, o arginina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen celulosa o sus derivados, glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; y alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol.

La composición se formula de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a humanos. Típicamente, las composiciones para la administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición farmacéutica puede incluir además un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se proporcionan separadamente, o mezclados conjuntamente, en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado como un ampolleta o bolsita, indicando la cantidad de agente activo. Cuando la composición farmacéutica se administra por infusión, ésta se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de grado farmacéutico estéril. Cuando la composición se administra por inyección, una ampolleta de agua estéril para inyección o solución salina se puede proporcionar de manera que los ingredientes se pueden mezclar antes de la administración.

Las composiciones de la invención pueden formularse como formas salinas o neutras. Las sales farmacéuticamente

aceptables incluyen las que se forman con aniones tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las que se forman con cationes tales como los derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxido férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, por mencionar unas cuantas.

5 Varios sistemas de entrega se conocen en la técnica y pueden usarse para administrar una proteína PLA2R o fragmentos de esta, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, y microcápsulas (ver, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem., 262:4429-4432 (1987)). La composición puede ser entregada en una vesícula, en particular un liposoma (ver, Langer, Science, 249:1527-1533 (1990); Treat y otros, en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler, eds. (Liss, Nueva York 1989), pp. 353-365; Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; ver, generalmente, *ibid.*). Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, y oral. Las composiciones pueden administrarse por cualquier vía adecuada, por ejemplo mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de recubrimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir las composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, incluyendo la inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede ser facilitada por un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un reservorio, tal como un reservorio un reservorio de Omcana. La administración pulmonar también puede ser empleada, por ejemplo mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de atomización.

En una modalidad, la formulación farmacéutica que se usa para la administración terapéutica debe estar estéril. La esterilidad se alcanza fácilmente por la filtración a través de membranas estériles de filtración (por ejemplo, membranas de 0.2 micrón). El pH de la formulación farmacéutica típicamente debe ser aproximadamente de 6 a 8.

25 En una modalidad, la composición puede administrarse en un sistema de liberación controlada. En una modalidad, se puede usar una bomba (ver Langer, arriba; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng., 14:201 (1987); Buchwald y otros, Surgery, 88:507 (1980); Saudek y otros, N. Engl. J. Med., 321:574 (1989)). En otra modalidad, se pueden usar materiales poliméricos (ver, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise, eds. (CRC Press, Boca Raton, Fla. 1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball, eds. (Wiley, Nueva York 1984); Ranger y Peppas, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem., 23:61 (1983); ver también Levy y otros, Science, 228:190 (1985); During y otros, Ann. Neurol., 25:35 1 (1989); Howard y otros, J. Neurosurg., 7 1:105 (1989)). Otros sistemas de liberación controlados se discuten en la revisión de Langer ,(Science 249: 1527-1533 )(1990). Para ejemplos de composiciones de liberación sostenida, ver la patente de Estados Unidos núm. 3,773,919, EP 58,481A, patente de Estados Unidos núm. 3,887,699, EP 158,277A, Patente Canadiense núm. 1176565, U. Sidman y otros, Biopolymers 22:547 (1983) y R. Langer y otros, Chem. Tech. 12:98 (1982).

40 La dosis precisa que se emplea en la formulación también dependerá de la vía de administración, y la gravedad de la MN y el título de auto-anticuerpos contra PLA2R en el suero, y debe decidirse de acuerdo con el juicio del médico y cada circunstancia del paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de los sistemas de prueba *in vitro* o en modelos animales.

45 La dosificación administrada a un paciente típicamente es de 0.1 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal del paciente. Preferentemente, la dosificación administrada a un paciente es entre 0.1 mg/kg y 20 mg/kg de peso corporal del paciente, con mayor preferencia 1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal del paciente. Para la terapia génica, el vector viral debe estar en el intervalo de  $1 \times 10^6$  a  $10^{14}$  partículas de vector viral por aplicación por paciente.

50 Además, los ensayos *in vitro* o *in vivo* pueden emplearse, opcionalmente, para ayudar a identificar los intervalos óptimos de dosificación. La dosis precisa que se emplea también dependerá de la vía de administración, y la gravedad de la afección que se trata y debe decidirse de acuerdo con el juicio del médico y las circunstancias de cada sujeto considerando, por ejemplo, estudios clínicos publicados. Las cantidades de dosificación eficaces adecuadas, sin embargo, están en el intervalo de aproximadamente 10 microgramos a aproximadamente 5 gramos aproximadamente cada 4 horas, aunque estas son típicamente aproximadamente 500 mg o menos cada 4 horas. En una modalidad, la dosificación eficaz es aproximadamente 0.01 mg, 0.5 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 900 mg, aproximadamente 1 g, aproximadamente 1.2 g, aproximadamente 1.4 g, aproximadamente 1.6 g, aproximadamente 1.8 g, aproximadamente 2.0 g, aproximadamente 2.2 g, aproximadamente 2.4 g, aproximadamente 2.6 g, aproximadamente 2.8 g, aproximadamente 3.0 g, aproximadamente 3.2 g, aproximadamente 3.4 g, aproximadamente 3.6 g, aproximadamente 3.8 g, aproximadamente 4.0 g, aproximadamente 4.2 g, aproximadamente 4.4 g, aproximadamente 4.6 g, aproximadamente 4.8 g, o aproximadamente 5.0 g, cada 4 horas. Las dosis equivalentes se pueden administrar durante diversos períodos de tiempo que incluyen, no se limitan a, aproximadamente cada 2 horas, aproximadamente cada 6 horas, aproximadamente cada 8 horas, aproximadamente

cada 12 horas, aproximadamente cada 24 horas, aproximadamente cada 36 horas, aproximadamente cada 48 horas, aproximadamente cada 72 horas, aproximadamente todas las semanas, aproximadamente cada dos semanas, aproximadamente cada tres semanas, aproximadamente todos los meses, y aproximadamente cada dos meses. Las cantidades de dosificación eficaces descritas en la presente descripción se refieren a cantidades totales administradas.

5 Las composiciones que comprenden proteína PLA2R, fragmentos de esta, o vectores de expresión y/o vectores virales se administran de forma adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Para propósitos en la presente descripción, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una composición que comprende la proteína PLA2R, fragmentos de esta, o vectores de expresión y/o vectores virales es una cantidad que es eficaz para reducir la cantidad de auto-anticuerpos contra PLA2R en una muestra de un sujeto. La reducción de la cantidad es al menos reducción del  
10 10% en los auto-anticuerpos en comparación con la cantidad de auto-anticuerpos presentes en el suero antes del inicio de un tratamiento.

En una modalidad, la composición que comprende un PLA2R o fragmentos de este se administra en combinación con terapias inmunosupresivas, que incluyen, pero no se limitan a, azatioprina, infliximab, omalizumab, daclizumab, adalimumab, eculizumab, efalizumab, natalizumab, y omalizumab. En otra modalidad, la composición que comprende un PLA2R o fragmentos de este se administra en combinación con terapias inmunosupresivas y ciclofosfamida, clorambucil, y/o rituximab.  
15

### 20 *Terapia génica*

La proteína PLA2R o fragmentos de esta se pueden administrar a un individuo por cualquiera de varias técnicas de terapia génica conocidos por los expertos en la técnica. Generalmente, la terapia génica se puede llevar a cabo ya sea por transformación directa de células objetivo en el sujeto mamífero (terapia génica *in vivo*) o transformación de las células *in vitro* y posterior implantación de las células transformadas en el sujeto mamífero (terapia génica *ex vivo*). Un vector viral porta una proteína de ácido nucleico que codifica la proteína PLA2R o fragmentos de esta bajo un elemento regulador específico de tejido que se administra a un individuo. El elemento regulador específico de tejido permite la expresión de la proteína PLA2R o fragmentos de esta en las células objetivo, por ejemplo, los músculos.  
25

Los principios de la terapia génica se describen por Oldham, R. K. (In: Principles of Biotherapy, Raven Press, N.Y., 1987), y textos similares. Las descripciones de los métodos y usos de la terapia génica se proporcionan por Boggs, S. S. (Int. J. Cell Clon. 8:80-96 (1990)); Karson, E. M. (Biol. Reprod. 42:39-49 (1990)); Ledley, F. D., In: Biotechnology, A Comprehensive Treatise, volumen 7B, Gene Technology, VCH Publishers, Inc. NY, pp 399-458 (1989)).  
30

El ácido nucleico que codifica la proteína PLA2R o fragmentos de esta se pueden introducir en las células somáticas de un animal (particularmente mamíferos que incluyen humanos) en terapia génica. Con la máxima preferencia, los vectores viral o retroviral se emplean para este propósito como vehículo de transferencia. El virus de la terapia génica puede ser en forma de un adenovirus, virus adeno-asociado o lentivirus.  
35

Los vectores retrovirales son un modo común de entrega y en este contexto son retrovirus del que se han suprimido o alterado todos los genes virales de manera que las proteínas no virales se elaboran en las células infectadas con el vector. Las funciones de replicación viral se proporcionan por el uso de células de "empaquetamiento" de retrovirus que producen todas las proteínas virales, pero que no producen virus infecciosos.  
40

La introducción del vector retroviral ADN en las células de empaquetamiento resulta en la producción de viriones que portan vector ARN y pueden infectar células objetivo, pero tal que no se produce la propagación del virus adicional después de la infección. Para distinguir este proceso de una infección por el virus natural donde el virus continúa replicándose y propagándose, se usa frecuentemente el término transducción en lugar de infección.  
45

El tratamiento de MN como se describe en la presente descripción puede incluir un lentivirus recombinante para la entrega y expresión de una proteína PLA2R o fragmentos de esta, ya sea en células de mamíferos que se dividen y que no se dividen. El VIH-1 basado en lentivirus puede transducir efectivamente una variedad de huéspedes más amplia que sistemas retrovirales basados en Virus de la Leucemia de Moloney (MoMLV). La preparación de lentivirus recombinante se puede lograr usando vectores pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ o pLenti junto con sistemas de expresión ViraPower™ lentivirales de Invitrogen.  
50

Los ejemplos de uso de vectores lentivirales para la terapia génica para trastornos hereditarios y varios tipos de cáncer, y se incorporan de ese modo como referencia (Klein, C. y Baum, C. (2004). Hematol. J., 5, 103-111; Zufferey, R y otros (1997). Nat. Biotechnol., 15, 871-875; Morizono, K. y otros (2005). Nat. Med., 11, 346-352; Di Domenico, C. y otros (2005), Hum. Gene Ther., 16, 81-90; Kim, E. Y., y otros, (2004). Biochem. Biophys. Res. Comm., 318, 381-390).  
55

Vectores no retrovirales también se han usado en la terapia genérica. Una de tal alternativa es el adenovirus (Rosenfeld, M. A., y otros, Cell 68:143155 (1992); Jaffe, H. A. y otros, Nature Genetics 1:372-378 (1992); Lemarchand, P. y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 89:6482-6486 (1992)). Las principales ventajas de los vectores de adenovirus son  
60

su potencial para portar grandes segmentos de ADN (genoma de 36 Kb), un título muy alto ( $10^{11}$  /ml), capacidad para infectar células no replicantes, e idoneidad para infectar los tejidos in situ, especialmente en el pulmón. El uso más sorprendente de este vector hasta ahora es entregar un gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística humana (CFTR) mediante instilación intratraqueal, al epitelio de las vías respiratorias en ratas algodónera (Rosenfeld, M. A., y otros, *Cell* 63:143-155 (1992)). De manera similar, los virus del herpes pueden resultar útiles también para la terapia génica humana (Wolfe, J. H. y otros, *Nature Genetics* 1:379-384 (1992)). Por supuesto, cualquier otro vector viral adecuado se puede usar para la terapia genética con la presente invención.

La patente de Estados Unidos núm. 6,531,456 proporciona métodos para la transferencia exitosa de un gen en una célula tumoral sólida usando viriones de AAV recombinantes. Generalmente, el método descrito en la patente de Estados Unidos núm. 6,531,456 permite la inyección directa, in vivo de los viriones de AAV recombinantes en masas de células tumorales, por ejemplo, por inyección intratumoral. La invención proporciona también la entrega simultánea de un segundo gen usando los viriones AAV recombinantes, en donde el segundo gen es capaz de proporcionar un efecto terapéutico auxiliar cuando se expresa dentro de la célula transducida.

El virión usado para la terapia génica puede ser cualquier virion conocido en la técnica, que incluye pero no se limita a los derivados de adenovirus, virus adeno-asociado (AAV), retrovirus, y lentivirus. Los virus recombinantes proporcionan un sistema versátil para los estudios de expresión génica y aplicaciones terapéuticas.

Los viriones AAV recombinantes descritos anteriormente, que incluyen el ADN de interés, se pueden producir usando la metodología convencional, conocida por los expertos en la técnica. Los métodos implican generalmente las etapas de (1) introducir un vector de AAV en una célula huésped; (2) introducir un constructo auxiliar de AAV en la célula huésped, donde el constructo auxiliar incluye regiones codificantes de AAV que se expresan en la célula huésped para complementar las funciones auxiliares de AAV que faltan del vector AAV; (3) introducir uno o más virus auxiliares y/o vectores de función accesoria en la célula huésped, en donde el virus auxiliar y/o vectores de función accesoria proporcionan funciones accesorias capaces de soportar la producción de virion AAV recombinante eficiente ("rAAV") en la célula huésped; y (4) cultivar la célula huésped para producir viriones rAAV. El vector AAV, constructo auxiliar AAV y el virus auxiliar o vector (s) de función accesoria se pueden introducir en la célula huésped ya sea simultáneamente o en serie, usando técnicas de transfección estándar. Usando vectores de VAAr, los genes se pueden entregar en una amplia variedad de células huésped, que incluyen muchas líneas celulares diferentes humanas y no humanas o tejidos. Debido a que el AAV no es patógeno y no hace ilícito una respuesta inmune, una multitud de estudios pre-clínicos han reportado excelentes perfiles de seguridad. Los rAAVs son capaces de transducir una amplia variedad de tipos de células y la transducción no depende de la división de la célula huésped activa. Los altos títulos,  $> 10^8$  partícula viral /ml, se obtienen fácilmente en el sobrenadante y con más concentración  $10^{11}$  -  $10^{12}$  partícula viral/ml. El transgén se integra en el genoma del huésped así la expresión es a largo plazo y estable.

Un sistema simplificado para generar adenovirus recombinantes se presenta por He TC. y otros *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 95:2509-2514, 1998. El gen de interés se clona primero en un vector lanzadera, por ejemplo, pAdTrack-CMV. El plásmido resultante se lineariza mediante digestión con endonucleasa de restricción Pme I, y posteriormente se cotransforma en las células BJ5183 de *E. coli*. con un plásmido de cadena principal adenoviral, por ejemplo, pAdEasy-1 del Sistema de Vector Adenoviral AdEasy™ de Stratagene. Se seleccionan los vectores de adenovirus recombinantes para la resistencia a la kanamicina, y la recombinación se confirma mediante análisis de endonucleasa de restricción. Por último, el plásmido recombinante linearizado se transfecta en las líneas celulares de empaquetamiento de adenovirus, por ejemplo células HEK 293 (células de riñón embrionario humano transformado con E1) o 911 (células de la retina embrionaria humana transformadas con E1) (*Human Gene Therapy* 7:215-222, 1996). Los adenovirus recombinantes se generan dentro de las células HEK 293.

El uso de serotipos de AAV alternativos distintos de AAV-2 (Davidson y otros (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(7):3428-32; Passini y otros (2003), *J. Virol.* 77(12):7034-40) ha demostrado tropismos celulares diferente y aumento de las capacidades de transducción. Con respecto a los cánceres de cerebro, el desarrollo de nuevas técnicas de inyección en el cerebro, específicamente entrega mejorada por convección (CED; Bobo y otros (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(6):2076-80; Nguyen y otros (2001), *Neuroreport* 12(9):1961-4), ha mejorado significativamente la capacidad de transducir grandes áreas del cerebro con un vector de AAV.

La preparación a gran escala de vectores de AAV se hace por una cotransfección de tres plásmidos de una línea celular de empaquetamiento: vector AAV que porta una secuencia codificante de ADN de un oligonucleótido antisentido para hnRNPLL o una molécula de ácido nucleico ARNip hnRNPLL, vector AAV RC que contiene AAV rep y genes cap, y el plásmido auxiliar de adenovirus pDF6, en placas 50 x 150 mm de células 293 subconfluentes. Las células se recogen tres días después de la transfección, y los virus se liberan por tres ciclos de congelación-descongelación o mediante ultrasonido.

Los vectores de AAV se purifican además por dos métodos diferentes dependiendo del serotipo del vector. El vector AAV2 se purifica por el método de purificación en columna de flujo por gravedad de un solo paso en función de su

afinidad por la heparina (Auricchio, A., y otros, 2001, Human Gene therapy 12:71-6; Summerford, C. and R. Samulski, .1998, J. Virol. 72:1438-45; Summerford, C. y R. Samulski, 1999, Nat. Med. 5: 587-88). Los vectores AAV2/1 y AAV2/5 se purifican por tres gradientes secuenciales de CsCl.

5 Las composiciones farmacéuticas para el uso como se describe en la presente descripción se pueden entregar sistémicamente a través de terapia adicional *in vivo*. Una variedad de métodos se han desarrollado para lograr la transformación *in vivo* que incluyen medios mecánico (por ejemplo, la inyección directa de ácido nucleico en las células objetivo o bombardeo de partículas), virus recombinantes, liposomas y endocitosis mediada por receptor (RME) (para revisiones, ver Chang y otros 1994 Gastroenterol. 106:1076-84; Morsy y otros 1993 JAMA 270:2338-45; y Ledley 1992 J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 14:328-37).

15 Otro método de transferencia de genes para el uso en humanos es la transferencia de ADN plasmídico en liposomas directamente a las células humanas *in situ* (Nabel, E. G., y otros, Science 249:1285-1288 (1990)). El ADN plasmídico debe ser fácil de certificar para el uso en la terapia génica humana ya que, a diferencia de los vectores retrovirales, se puede purificar hasta la homogeneidad. Adicionalmente a la transferencia de ADN mediada por liposomas, otros varios métodos físicos de transferencia de ADN, tales como los dirigidos a receptores ADN en las células mediante la conjugación del ADN plasmídico a las proteínas, se han mostrado prometedores en la terapia génica humana (Wu, G. Y., y otros, J. Biol. Chem. 266:14338-14342 (1991); Curiel, D. T., y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8850-8854 (1991)).

20 Para los virus de terapia génica, la dosificación está en el intervalo de  $10^6$  a  $10^{14}$  partículas por aplicación. Como alternativa se puede usar el método de entrega biolístico de pistola génica. La pistola génica es un dispositivo para inyectar las células con información genética, diseñado originalmente para la transformación de planta. La carga útil es una partícula elemental de un metal pesado recubierto con ADN plasmídico. Esta técnica se refiere frecuentemente simplemente como biolística. Otro instrumento que usa la tecnología biolística es el sistema de entrega de partículas PDS-1000/He. Las proteínas, vector de expresión, y/o virus de la terapia génica se pueden recubrir sobre partículas minúsculas de oro, y estas partículas recubiertas se "disparan" bajo alta presión en los tejidos biológicos tales como hemangiomas y el melanoma. Un ejemplo del método basado en la pistola génica se describe para la vacunación basada en ADN del ganado por Loehr B. I. y otros J. Virol. 2000, 74:6077-86.

30 Expresiones alternativas del concepto de la invención se pueden definir por cualquiera de los siguientes párrafos en orden alfabético:

35 **[A]** Un método para diagnosticar la nefropatía membranosa (MN) en un sujeto, el método que comprende detectar la presencia de anticuerpos que son reactivos a un receptor de fosfolipasa A2 (PLA2R), en donde los anticuerpos se encuentran en una muestra de un sujeto.

**[B]** El método del párrafo [A], en donde la MN es idiopática.

40 **[C]** El método del párrafo [A], en donde el sujeto es un humano.

**[D]** El método de cualquiera de los párrafos [A]-[C], en donde no se realiza una biopsia del riñón.

45 **[E]** El método del párrafo [A], en donde el PLA2R es un PLA2R de mamífero.

**[F]** El método del párrafo [A], donde la muestra es una muestra de sangre.

**[G]** El método del párrafo [A], en donde los anticuerpos son de la subclase IgG: IgG1-4.

50 **[H]** El método de cualquiera de los párrafos [A]-[G], en donde la detección se realiza mediante un inmunoensayo serológico.

**[I]** Un método de evaluación pronóstico en un sujeto que se trata para la MN, el método que comprende:

55 a. determinar en un primer intervalo de tiempo un nivel de anticuerpos que son reactivos a un PLA2R, en donde los anticuerpos se encuentran en una muestra de un sujeto;

b. determinar en un segundo intervalo de tiempo un nivel de anticuerpos que son reactivos a un PLA2R, en donde el segundo intervalo de tiempo es después del primer intervalo de tiempo; y

60 c. comparar los niveles de anticuerpos de los dos intervalos de tiempos, en donde una disminución en el nivel de anticuerpos en el segundo intervalo de tiempo en comparación con el primer intervalo de tiempo indica que el tratamiento es eficaz.

**[J]** Un método de evaluación pronóstico en un sujeto para la MN, el método que comprende:

- a. determinar en un primer intervalo de tiempo un nivel de anticuerpos que son reactivos a un PLA2R, en donde los anticuerpos se encuentran en una muestra de un sujeto; y  
 b. determinar en un segundo intervalo de tiempo un nivel de anticuerpos que es reactivo a un PLA2R, en donde el segundo intervalo de tiempo es después del primer intervalo de tiempo;

5

en donde cuando el nivel de anticuerpos en el segundo intervalo de tiempo disminuye más abajo de un límite de detección indica que existe remisión.

**[K]** Un método de evaluación pronóstico en un sujeto para la MN, el método que comprende:

10

- a. determinar en un primer intervalo de tiempo un nivel de anticuerpos que son reactivos a un PLA2R, en donde los anticuerpos se encuentran en una muestra de un sujeto;  
 b. determinar en un segundo intervalo de tiempo un nivel de anticuerpos que son reactivos a un PLA2R, en donde el segundo intervalo de tiempo es después del primer intervalo de tiempo;

15

- c. comparar los niveles de anticuerpos de los dos intervalos de tiempos, en donde un aumento en el nivel de anticuerpos en el segundo intervalo de tiempo en comparación con el primer intervalo de tiempo indica que existe recaída de la nefropatía membranosa.

**[L]** El método del párrafo [I], [J] o [K], en donde la MN es idiopática.

20

**[M]** El método del párrafo [I], [J] o [K], en donde el sujeto es un humano.

**[N]** El método de cualquiera de los párrafos [I], [J] o [K], en donde no se realiza una biopsia del riñón.

25

**[O]** El método del párrafo [I], [J] o [K], en donde el PLA2R es un PLA2R de mamífero.

**[P]** El método del párrafo [I], [J] o [K], en donde la muestra es una muestra de sangre.

**[Q]** El método del párrafo [I], [J] o [K], en donde los anticuerpos son de la subclase IgG: IgG 1-4.

30

**[R]** El método de cualquiera de párrafos [L]-[Q], en donde la detección se realiza mediante un inmunoensayo serológico.

**[S]** El método del párrafo [I], en donde el tratamiento es un tratamiento inmunosupresor.

35

**[T]** Un método de tratamiento de MN en un sujeto, el método que comprende eliminar ex vivo un anticuerpo que es reactivo a un PLA2R de una muestra en un sujeto.

**[U]** El método del párrafo [T], en donde el sujeto es un humano.

40

**[V]** El método del párrafo [T], en donde la MN es idiopática.

**[W]** El método del párrafo [T], en donde el receptor de fosfolipasa A2 es un PLA2R de mamífero.

45

**[X]** El método del párrafo [T], donde la muestra es una muestra de sangre.

**[Y]** El método del párrafo [T], en donde los anticuerpos son de la subclase IgG: IgG1-4.

**[Z]** El método del párrafo [T], en donde los anticuerpos se eliminan de la sangre por inmunoabsorción.

50

**[AA]** El método del párrafo [T], en donde la muestra se devuelve de nuevo en el sujeto después de la eliminación de los anticuerpos.

**[BB]** Un método de tratamiento de MN en un sujeto, el método que comprende administrar una cantidad eficaz de PLA2R o fragmentos de este o un vector que expresa un PLA2R o fragmentos de este.

55

**[CC]** El método del párrafo [BB], en donde la MN es idiopática.

**[DD]** El método del párrafo [BB], en donde el sujeto ha dado positivo por anticuerpos reactivos contra un PLA2R

60

**[EE]** El método del párrafo [BB], en donde el receptor de fosfolipasa A2 es un PLA2R de mamífero.

**[FF]** Una composición para el tratamiento de la MN idiopática, la composición que comprende un PLA2R o fragmentos de estos.

**[GG]** Un uso de una cantidad eficaz de PLA2R o fragmentos de este o un vector que expresa un PLA2R o fragmentos de este para el tratamiento de la MN en un sujeto.

5 **[HH]** Un uso de una cantidad eficaz de PLA2R o fragmentos de este o un vector que expresa un PLA2R o fragmentos de este en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de MN en un sujeto.

**[II]** El uso del párrafo [GG] o [HH], en donde la MN es idiopática.

10 **[JJ]** El uso del párrafo [GG] o [HH], en donde el sujeto ha dado positivo por anticuerpos reactivos contra un PLA2R

**[KK]** El uso del párrafo [GG] o [HH], en donde el receptor de la fosfolipasa A2 es un PLA2R de mamífero.

**[LL]** Un inmunoensayo que comprende:

- 15 a. poner en contacto una muestra de un sujeto con un PLA2R o fragmento PLA2R de este  
 b. formar un complejo anticuerpo-proteína entre el anticuerpo presente en una muestra con el PLA2R o fragmento PLA2R de este;  
 c. lavar para eliminar cualquier anticuerpo no unido;  
 d. adicionar un anticuerpo de detección que se marca y es reactivo con el anticuerpo de la muestra;  
 20 e. lavar para eliminar cualquier anticuerpo de detección marcado no unido; y  
 f. convertir la etiqueta a una señal detectable, en donde la presencia de una señal detectable indica la probabilidad de MN en el sujeto

**[MM]** El inmunoensayo del párrafo [LL], en donde la MN es idiopática.

25 **[NN]** El inmunoensayo de párrafo [LL] o [MM], en donde, el sujeto es un humano.

**[OO]** El inmunoensayo de párrafo [LL], [MM] o [NN], en donde la muestra es una muestra de sangre.

30 **[PP]** El inmunoensayo de cualquier párrafo [LL]-[OO], en donde una biopsia del riñón no se realiza en el sujeto.

**[QQ]** El inmunoensayo de cualquier de párrafo [LL]-[PP], en donde el PLA2R es un PLA2R de mamífero.

**[RR]** El inmunoensayo de cualquier de párrafo [LL]-[QQ], en donde los anticuerpos son de la subclase IgG: IgG1-4.

35 **[SS]** El inmunoensayo de cualquier párrafo [LL]-[RR], en donde el PLA2R o fragmento de proteína de este PLA2R se deposita o inmoviliza sobre un soporte sólido.

40 **[TT]** El inmunoensayo de cualquiera de párrafo [LL]-[SS], en donde una cantidad conocida de un PLA2R o fragmento de proteína de PLA2R se deposita o acopla a un soporte sólido.

**[UU]** El inmunoensayo del párrafo [SS] o [TT], en donde el soporte está en el formato de una varilla graduada, una tira de prueba, una perla de látex, una microesfera o una placa de múltiples pocillos.

45 **[VV]** El inmunoensayo de cualquier párrafo [LL]-[UU], en donde el anticuerpo de detección se marca mediante la enlace covalente a una enzima, la etiqueta con un compuesto fluorescente o metal, o la etiqueta con un compuesto quimioluminiscente.

50 **[WW]** El inmunoensayo de cualquier párrafo [LL]-[VV], en donde el anticuerpo de detección es específicamente reactivo con el sujeto.

**[XX]** El inmunoensayo de cualquier párrafo [LL]- [WW], en donde la señal detectable se compara con un conjunto de señales detectables de una curva de titulación derivada de inmunoensayos de cantidades conocidas de PLA2R o fragmentos en cantidad creciente.

55 **[YY]** El inmunoensayo de cualquier párrafo [LL]- [XX], en donde el inmunoensayo se realiza para una pluralidad de muestras de un sujeto obtenida en un periodo de tiempo.

**[ZZ]** El inmunoensayo del párrafo [YY], en donde se obtiene la pluralidad de muestras cada dos o tres meses durante al menos un período de dos años.

60 **[AAA]** El inmunoensayo del párrafo [ZZ], en donde la señal detectable de cada inmunoensayo se compara con la señal detectable de una muestra obtenida de un intervalo de tiempo consecutivamente previo, en donde una reducción del 10% de la señal detectable indica el tratamiento eficaz de MN en el sujeto.

**[BBB]** Un inmunoensayo que comprende:

- a. poner en contacto una muestra de un sujeto con un PLA2R o fragmento PLA2R de este;
- b. formar un complejo anticuerpo-proteína entre el anticuerpo presente en una muestra con el PLA2R o fragmento PLA2R de este;
- c. medir una intensidad de dispersión de luz resultante de la formación del complejo anticuerpo-proteína en donde la intensidad de dispersión de luz de al menos 10% por encima de una intensidad de dispersión de luz de control de la dispersión indica la probabilidad de MN o la recaída de MN en el sujeto.

5

**[CCC]** El inmunoensayo de cualquier párrafo [BBB], en donde el PLA2R o fragmento de proteína de este PLA2R se deposita o inmoviliza sobre un soporte sólido.

10

**[DDD]** El inmunoensayo del párrafo [CCC], en donde el soporte sólido es una perla de látex o una microesfera.

15

**[EEE]** El inmunoensayo de cualquier párrafo [BBB]-[DDD], en donde la intensidad de dispersión de luz de control es la de PLA2R o fragmento de proteína de PLA2R en ausencia de la muestra.

**[FFF]** El inmunoensayo de cualquier párrafo [BBB]-[EEE], en donde la intensidad de dispersión de luz se mide en un nefelómetro.

20

**[GGG]** El inmunoensayo de cualquier párrafo [BBB]-[FFF], en donde el inmunoensayo se realiza para una pluralidad de muestras de un sujeto obtenida en un periodo de tiempo.

**[HHH]** El inmunoensayo del párrafo [GGG], en donde se obtiene la pluralidad de muestras cada dos o tres meses durante al menos un período de dos años.

25

**[III]** El inmunoensayo de párrafo [HHH], en donde la intensidad de dispersión de luz de cada inmunoensayo se compara con la intensidad de dispersión de luz de una muestra obtenida de un Intervalo de tiempo previo consecutivamente, en donde una reducción del 10% de la intensidad de dispersión de la luz indica efectiva tratamiento de MN en el sujeto

30

**[JJJ]** Un dispositivo para identificar la presencia o el nivel de anticuerpos que son reactivos a un PLA2R en una muestra de un sujeto que comprende:

- a. al menos una proteína PLA2R o fragmentos de esta; y
- b. al menos un soporte sólido en donde la proteína PLA2R o fragmentos de esta se deposita sobre el soporte.

35

**[KKK]** El dispositivo de párrafo [JJJ], en donde al menos una proteína PLA2R o fragmentos de esta que se deposita sobre el soporte sólido se inmoviliza sobre el soporte.

40

**[LLL]** El dispositivo del párrafo [JJJ], en donde el soporte sólido está en el formato de una varilla graduada, una tira de prueba, una perla de látex, una microesfera o una placa de múltiples pocillos.

**[MMM]** El dispositivo del párrafo [JJJ], en donde el sujeto es un humano.

45

**[NNN]** El dispositivo del párrafo [JJJ], en donde una biopsia del riñón no se realiza en el sujeto.

**[OOO]** El dispositivo del párrafo [JJJ], en donde la muestra del sujeto es una muestra de sangre.

50

**[PPP]** El dispositivo del párrafo [JJJ], en donde la proteína PLA2R es una proteína PLA2R humana o de cerdo.

**[QQQ]** El dispositivo del párrafo [JJJ] que comprende además una segunda proteína PLA2R marcada o fragmentos de esta que produce una señal detectable.

55

**[RRR]** El dispositivo del párrafo [JJJ] que comprende además un anticuerpo de detección, en donde el anticuerpo de detección es específico para los anticuerpos que son reactivos a un PLA2R en la muestra del sujeto y el anticuerpo de detección produce una señal detectable.

60

**[SSS]** El dispositivo del párrafo [JJJ], en donde el dispositivo realiza un inmunoensayo en donde se forma un complejo anticuerpo-proteína.

**[TTT]** El dispositivo del párrafo [SSS], en donde el inmunoensayo es un inmunoensayo serológico.

[UUU] El dispositivo del párrafo [SSS], en donde el inmunoensayo es un inmunoensayo nefrelométrico.

[VVV] El uso de cualquiera de los dispositivos de los párrafos [JJJ]-[SSS] para facilitar el diagnóstico de la nefropatía membranosa en un sujeto, en donde una cantidad detectable de anticuerpos que son reactivos a un PLA2R indica la probabilidad de nefropatía membranosa en el sujeto.

[WWW] Un estuche que comprende un dispositivo del párrafo [JJJ] y un anticuerpo de detección, en donde el anticuerpo de detección es específico para los anticuerpos que son reactivos a un PLA2R en la muestra del sujeto y produce una señal detectable.

[XXX] Un estuche un dispositivo del párrafo [JJJ] y una segunda proteína PLA2R marcada o fragmentos de esta que produce una señal detectable.

[YYY] Un estuche que comprende un dispositivo del párrafo [JJJ] y una cubeta del nefelómetro.

[ZZZ] Un sistema que comprende:

- a. un módulo de medición para medir la información del auto-anticuerpo que comprende una señal detectable de un inmunoensayo indicando la presencia o nivel de anticuerpos que son reactivos a un PLA2R de una muestra obtenida de un sujeto;
- b. un módulo de almacenamiento configurado para la salida de datos de memoria desde el módulo de medición;
- c. un módulo de comparación adaptado para comparar los datos almacenados en el módulo de almacenamiento con datos de referencia y/o control, y para proporcionar un contenido recuperado, y
- d. un módulo de salida para visualizar el contenido recuperado para el usuario, en donde el contenido recuperado, la presencia de una cantidad detectable de anticuerpos reactivos contra PLA2R indica que el sujeto tiene MN o tiene una recaída de MN

[AAAA] El sistema del párrafo [ZZZ], en donde los datos de control comprenden datos de una población de individuos sanos no-MN.

[BBBB] Un sistema para facilitar la evaluación pronóstico de la MN en un sujeto, que comprende:

- a. un módulo de determinación configurado para recibir y salida de información del auto-anticuerpo a un PLA2R a partir de una muestra obtenida de un sujeto, en donde la información de auto-anticuerpos mide el nivel de autoanticuerpos que son reactivos al PLA2R.
- b. un módulo de almacenamiento configurado para almacenar información de salida a partir del módulo de determinación;
- c. un módulo de comparación adaptado para comparar los datos almacenados en el módulo de almacenamiento con datos de referencia y/o control, y para proporcionar un contenido de comparación recuperado, y
- d. un módulo de salida para visualizar el contenido de comparación para el usuario, en donde si no existe ninguna cantidad detectable de autoanticuerpos reactivos contra PLA2R entonces el sujeto está en remisión o si existe una reducción de al menos 10% a una lectura previa, entonces el tratamiento para MN es eficaz en el sujeto.

[CCCC] El sistema informático del párrafo [BBBB], en donde los datos de control comprenden datos anteriores del mismo sujeto en donde los datos anteriores habían indicado cantidades detectables de auto-anticuerpos.

[DDDD] Un medio de almacenamiento legible por computadora que comprende:

- a. un módulo de almacenamiento de datos que contiene datos de una muestra obtenida de un sujeto que representa un nivel de señal de un inmunoensayo para anticuerpos que son reactivos a un PLA2R;
- b. un módulo de comparación que compara los datos almacenados en el módulo de almacenamiento de datos con datos de referencia y/o datos de control, y para proporcionar un contenido de comparación, y
- c. un módulo de salida que muestra el contenido de comparación para el usuario, en donde la presencia de una cantidad detectable de anticuerpos reactivos contra PLA2R de al menos 10% en relación con los datos de referencia y/o datos de control indica que el sujeto tiene MN o tiene una recaída de MN.

[EEEE] El sistema del párrafo [DDDD], en donde los datos de control comprenden datos de una población de individuos sanos no-MN.

Esta invención se ilustra además por los siguientes ejemplos, los cuales no deben interpretarse como limitantes.

#### EJEMPLO

*Materiales y Métodos**Suero humano*

5 Con la aprobación de la Junta de Revisión Institucional de la Universidad de Boston, hemos recogido y almacenado muestras de suero codificados de pacientes con nefropatía membranosa, otros trastornos glomerular o autoinmunes, y voluntarios normales. Los clasificados como que tienen MN idiopática tienen MN demostrada por biopsia en ausencia de características secundarias tradicionales, tales como serologías positivas de anticuerpos anti-nucleares (ANA),  
 10 anticuerpos anti-ADN de cadena doble, o hepatitis B. Una clasificación adicional en estos grupos se discute en la Información Suplementaria

*Tejido de riñón humano*

15 Se obtuvieron riñones humanos que fueron no aptos para el trasplante y donados para la investigación del Banco de Órganos de Nueva Inglaterra. Los glomérulos se recogieron de la corteza renal picada mediante filtración a través de tamices de metal (ref) y se volvieron a suspender y extrajeron en un tampón RIPA que contiene detergente. (Boston BioProducts, Boston, MA) . La IgG contaminante se eliminó de esta preparación a través de la incubación con Proteína G Plus Inmovilizada (Thermo Fisher). Se usó péptido N-glicosidasa F (PNGasa F; New England Biolabs) en ausencia  
 20 de agente reductor para eliminar cuando se indica los residuos de azúcar con enlace N de las proteínas glomerulares. Para purificar parcialmente las glicoproteínas glomerulares, pasamos el extracto glomerular humano sobre columna de perlas de agarosa (Vector Laboratories) de aglutinina de germen de trigo (WGA) y eluimos las glicoproteínas unidas con 500 mM de N-acetil glucosamina (GlcNAc). Tanto el antígeno nativo como el de 200 kDa desglucosilado con PNGasa F se encontraron para unirse a la columna .

*Protocolo de membrana de Western*

Extracto glomerular humano o PLA2R expresado por célula humana se sometieron a electroforesis en condiciones no reductoras y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de acuerdo con protocolos estándar. Se realizó la  
 30 inmuno-electrotransferencia con suero humano como el anticuerpo primario, típicamente a 1:100 a 1:250, y el anticuerpo secundario en burro anti-IgG humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch) a 1:40,000. El anticuerpo PLA2R usado para estos experimentos es un anticuerpo policlonal de conejillo de indias generado contra el receptor completo de PLA2 de conejo purificado. Se reconoce la proteína humana tanto bajo condiciones reductoras como no reductoras de electroforesis en gel (Granata, F., y otros 1995, J. Immunol. 174: 464-74;  
 35 G. Lambeau, comunicación personal ). Se compraron anticuerpos de carnero contra las cuatro subclases de IgG a partir del Sitio de Unión y se usaron en las diluciones recomendadas por el fabricante.

*Análisis de espectrometría de masas e interpretación de datos.*

40 Se extirparon las regiones de interés de gel y se realizó la digestión con tripsina en gel como se describió anteriormente en Powell, 2003 Mol Cell Biol 23:5376-5387. Se analizaron los péptidos resultantes con una versión modificada de un método descrito anteriormente que acopla la cromatografía líquida (LC) con espectrometría de masas en tándem (MS/MS) (Powell, 2004, Mol Cell Biol 24:7249-7259). Se usaron los datos de MS adquiridos para buscar en la base de datos NCBI RefSeq Humana usando el algoritmo SEQUEST y se analizaron los datos con SequestSorcerer™ (Sage-N  
 45 Research, San Jose, CA).. El enriquecimiento o abundancia relativa de cada proteína identificada se determinó mediante la normalización del número de recuentos espectrales que coinciden con la proteína por su peso molecular predicho. Este valor se ha denominado un Factor de Abundancia de Proteína (PAF) (Powell, 2004, Mol Cell Biol 24:7249-7259).

*Inmunohistología*

50 Se congelaron secciones frescas de riñón humano en Solución de Temperatura Óptima de corte (TissueTek) y se cortaron secciones de 4 micras con un criotomo. Se obtuvieron secciones congeladas en serie de cinco biopsias de riñón MN del Dr. Helmut Rennke (Boston, MA). Se fijaron y permeabilizaron las secciones con metanol:acetona y  
 55 bloquearon con 10% de albúmina de suero bovino en TB. Para detectar PLA2R, se usaron anti-PLA2R de conejo en conejillo de indias a 1:400 y anti-IgG de conejillo de indias en burro conjugado con Cy3 (Jackson ImmunoResearch) a 1:500. Para demostrar la especificidad de la tinción, se limpió previamente el anticuerpo policlonal con un fragmento de PLA2R de conejo que contiene del 4to al 6to dominios de unión de lectina. Esto agotó significativamente la señal de inmunofluorescencia a PLA2R.

60 El diagnóstico de nefropatía membranosa se estableció mediante biopsia renal en todos los casos. Los clasificados como MN idiopática no tuvieron evidencia de características secundarias, que incluyen positividad para los anticuerpos anti-nucleares o anti-ADN de cadena doble, antigenemia por hepatitis B o depósitos densos de electrón en la biopsia

renal en lugares que no sean subepitelial. No se hizo un intento para descartar neoplasia oculta como una causa potencial de MN secundaria. Los otros trastornos glomerulares se diagnosticaron por biopsia (2 FSGS; 1 DN; 1 Henocho-Shonlein púrpura) o por características clínicas. Estas MN incluyeron muchos años con proteinuria gradualmente progresiva, proteinuria ortostática demostrada mediante muestras de orina divididas. Los pacientes con

5afecciones autoinmune o reumatológicas adicionales incluyeron el lupus eritematoso sistémico sin proteinuria significativa, dermatomiositis, esclerodermia/enfermedad de superposición mixta del tejido conectivo, y pénfigo ampolloso.

Dada la similitud de tamaño con IgG, inicialmente excluimos IgG como el objetivo de lo que podría haber sido una actividad similar a factor reumatoide en el suero membranoso. Los extractos glomerulares se trataron con perlas de agarosa con enlace a proteína G para eliminar la IgG contaminante que estaba invariablemente presente en el extracto glomerular. A la inversa, los sueros MN se incubaron con IgG agregada por calor covalentemente enlazada a perlas Affi-Gel-10 para adsorber fuera cualquier factor de suero que fueron reactivos con IgG. Las muestras de suero tratadas de esta manera demostraron una reactividad idéntica con el antígeno 200 kDa como lo hizo el suero de partida (datos no mostrados). Además, fueron capaces de mostrar las diferencias sutiles en la migración entre IgG y el MN-Ag en corridas de geles de agarosa de bajo porcentaje (6%) durante largos períodos de tiempo, y no se notó un cambio importante en el tamaño de IgG cuando se trató con PNGasa F. A pesar de nuestra confianza en que el antígeno objetivo no fue una inmunoglobulina, la similitud de tamaño con IgG humana y la necesidad de correr los geles en condiciones no reductoras para detectar el antígeno hizo la inmunoprecipitación de MN-Ag casi imposible, a pesar de los enfoques variados. Por lo tanto se acercaron a la tarea de identificar a este antígeno objetivo putativo en la nefropatía membranosa (MN- Ag) usando técnicas de purificación bioquímicas.

#### *Resultados*

##### *El suero MN reacciona con una proteína glomerular de 200 KDA*

Nuestro enfoque para la identificación del antígeno objetivo en la nefropatía membranosa humana se basó en la presunción de que los autoanticuerpos en el suero de pacientes con MN identificarían bandas candidatas por transferencia de tipo Western estándar de proteínas glomerulares humanas. Una banda consistentemente identificada no se detectó hasta que fortuitamente sometimos a electroforesis las proteínas bajo condiciones no reductoras, entonces una banda prominente, de aproximadamente 200 kDa se detectó por varios de los sueros que anteriormente habían sido negativo usando las condiciones de reducción más estándar. El ensayo de otro suero limitado y recogido nuevamente de pacientes con MN idiopática mostró reactividad similar en más del 50% de tales pacientes. En la Fig. 1A, todos los sueros de cinco MN reconocen una banda de aproximadamente 200 kDa, mientras que no lo hacen los sueros de los pacientes nefróticos de control. En el panel inferior de la Figura 1A, estos cinco sueros MN reactivos se usan para Membrana de Western alternando carriles de proteínas glomerulares nativas y desglicosilas (PNGasa F +). Los cinco sueros MN reaccionan idénticamente con el antígeno nativo de 200 kDa y una proteína desglicosilada de aproximadamente 150 kDa. Sorprendentemente, el suero de voluntarios normales (n = 23), pacientes con otras afecciones nefróticas tales como nefropatía diabética FSGS (n= 13), o pacientes con otros trastornos autoinmune, reumatológicos (n = 6) fueron todos no reactivo hacia este antígeno cuando se ensayó en condiciones idénticas. Un análisis más detallado de los pacientes con MN reveló que ninguno de los ocho casos de MN secundario (6 asociado al lupus y 2 asociado a hepatitis B) fueron reactivos para el antígeno de 200 kDa. La eliminación de cadenas de carbohidratos con enlace N con péptido N-glucosidasa (PNGasa) F causó un cambio significativo en la movilidad de este antígeno a aproximadamente 150 kDa, lo que indica que está fuertemente glicosilada. Todos los sueros inicialmente reactivos con la banda de 200 kDa nativa también identificaron la banda desglicosilada más pequeña (Figura 1A).

Para verificar la especificidad de la reactividad positiva de los autoanticuerpos anti-PLA2R de nefropatía idiopática membranosa, se aumentó el número de muestras de sujetos probados para los anticuerpos a PLA2R por Transferencia (de tipo) Western. Se aumentaron también los controles para n = 32 y los pacientes con otras afecciones nefróticas tales como la nefropatía diabética FSGS (n = 25). Adicionalmente a un aumento en el número de sujetos con MN idiopática en Boston (Massachusetts, Estados Unidos), se recibieron y probaron muestras de la Clínica Mayo en Rochester, (Minnesota, Estados Unidos), la Universidad de Lund en Suecia, y la Universidad en los Países Bajos. Se aumentó también el número de muestras de control de pacientes con MN secundaria, otras enfermedades autoinmunes y renales, como controles de la enfermedad y sujetos normales. Aproximadamente 72-82% de los pacientes con MN idiopática dio positivo para los anticuerpos anti-PLA2R mientras que ninguno de los controles normales o de enfermedad, o pacientes con formas secundarias de MN fue positivo (Figura 1 C).

Dada la evidencia de glicosilación significativa, se probó la capacidad del antígeno para unirse a varias columnas de lectina, y se encontró que se unió a aglutinina de germen de trigo (WGA), tanto en su forma nativa como N-desglicosilada. La unión de ambas formas pueden reflejar los carbohidratos residuales con enlace N que son inaccesibles a PNGasaF en las condiciones no reductoras necesarias para mantener la antigenicidad. Proteínas glomerulares humanas nativas y desglicosiladas se eluyeron de WGA y sometieron a electroforesis; las dos regiones de

gel correspondientes a las bandas de antígeno de 200 y 150 kDa en WB se extirparon, sometieron a digestión en gel con tripsina y analizaron por espectrometría de masas. Bajo el supuesto de que las secuencias de péptidos correspondientes al antígeno objetivo putativo se pueden identificar en ambas muestras, se generó una lista de identidades de candidatos para el antígeno MN putativo (ver Tabla 1). Usando anticuerpos disponibles y/o proteínas recombinantes, se evaluaron estos antígenos candidatos y se tuvo la suerte de encontrar una posible coincidencia cuando los anticuerpos para el receptor de la fosfolipasa A2 de tipo M identificaron una proteína de tamaño similar en los glomérulos humanos (Figura 2A).

#### Receptor de la fosfolipasa A2 en el antígeno objetivo en MN

Tanto el suero MN como el anti-PLA2R reconocen bandas idénticas en WB (membranas de Western) de extractos de glomérulos (Figura 2A). La proteína recombinante migra a una posición ligeramente más baja que la proteína nativa glomerular, aunque la deglicosilación con PNGasa F provoca a ambas migrar a la misma posición. PLA2R humana recombinante expresado en la célula (rPLA2R) electrotransferido con sueros MN produjo una banda distinta en WB que fue ligeramente menor que la señal correspondiente de glomérulos humanos. Sin embargo, cuando ambas muestras se deglicosilaron, emigraron a la misma posición (Figura 2A). Esto sugiere una pequeña diferencia en la glicosilación total entre la proteína nativa y la forma recombinante. Es importante destacar que, WB de estas mismas muestras con un anticuerpo policlonal mono específico contra PLA2R reveló un patrón idéntico. Desde entonces hemos confirmado que todas las muestras MN que son reactivas con la glicoproteína de 200 kDa de glomérulos humanos también reconocen rPLA2R, confirmando que la banda de 200 kDa de glomérulos humanos que se había estado investigando fue de hecho PLA2R.

Los sueros humanos que son reactivos con la 200 kDa MN-Ag por WB puede inmunoprecipitar (IP) PLA2R a partir de extractos glomerulares humanos (Figura. 2B). Todos los tres sueros MN reactivos son capaces de IP PLA2R a partir de tanto extractos de proteínas glomerulares humanas como cerdo, mientras que los controles no lo hacen. Cantidades apreciables de IgG inicial estaban presentes en todos los casos; la cantidad es menor en el carril 2 según este paciente fue particularmente nefrótico. Dos de los tres sueros no reactivos y todos, los tres sueros de control nefrótico no IP PLA2R en condiciones idénticas. Curiosamente, con uno de los sueros encontrado inicialmente que sea no reactivo por WB, una banda débil se detectó por IP (no visible en la reproducción). Cuando se volvió a ensayar el suero a una dilución 1:25, se encontró que identifica rPLA2R por WB (datos no mostrados). Esto puede sugerir que otros pacientes MN inicialmente pensaron no tener autoanticuerpos anti-PLA2R en su lugar pueden tener títulos de bajo nivel no fácilmente detectable por nuestro ensayo WB inicial (el tamizaje se realiza típicamente en una dilución de suero 1:100).

Adicionalmente, la Figura 2C muestra que la glicoproteína glomerular identificada por sueros MN reactivos es el receptor de la fosfolipasa A2 humana. Se usó suero humano completo para inmunoprecipitar (IP) proteínas glomerulares, y las IP se sometieron a electroforesis después y electrotransferieron por Western con un anticuerpo específico para el receptor de fosfolipasa A2 tipo M. Los primeros cinco carriles muestran IP's con sueros que fueron conocidos por ser positivo por WB (como en la Figura 1). El 6to carril representa una IP con suero de un paciente con MN que fue conocido por ser negativo. Los carriles 7 y 8 muestran IP's con suero de voluntarios normales, y en el carril final, el suero humano se omitió de la IP para descartar la unión no específica de proteínas glomerulares a la perlas de agarosa.

PLA2R recombinantes comparte el epítipo sensible a la reducción como lo hace la proteína nativa glomerular (Figura. 3A). En el WB en la que cantidades iguales de extracto glomerular humano (HGE) se sometieron a electroforesis en condiciones reductoras y no reductoras; PLA2R recombinante se trató de forma similar. WB se realizó con suero MN reactivo o un anticuerpo policlonal anti-PLA2R y se detecta con anticuerpos secundarios adecuados. La reactividad hacia el PLA2R nativo o recombinante está en el estado no reducido, se observaron tanto para suero MN como el policlonal anti-PLA2R. Sin embargo, mientras que anti-PLA2R reconoce el antígeno en forma reducida, el suero MN falla para detectar la proteína nativa o recombinante reducida. Tanto el antisuero anti-PLA2R mono específico como los sueros MN detecta fuertemente PLA2R glomerular nativa y recombinante por WB en condiciones no reductoras. Mientras que el anticuerpo policlonal todavía detecta ambas formas (aunque menos robusta) cuando se ejecuta en condiciones reductoras, los sueros MN no pueden reaccionar con cualquiera de las formas.

Las clases de IgG de los autoanticuerpos reactivos contra PLA2R, proteínas humanas glomerulares, PLA2R recombinante, y antígenos de *E. coli* se electrotransferieron con un único suero MN reactivo, seguido por anticuerpos específicos para las subclases de IgG. La subclase predominante que reacciona con el nativo o PLA2R es IgG4, mientras que es IgG2 para una proteína de 70 kDa de *E. coli* incluida como un control. Las cantidades relativas de las subclases IgG en este suero particular, se evaluaron mediante WB de suero total diluido con los anticuerpos específicos a la subclase. La forma IgG2 no se detecta bien en su forma desnaturalizada, pero está claramente presente como se detecta por su unión a la proteína de 70 kDa de *E. coli*. Se establece bien que los anticuerpos IgG que se detectan por microscopía de inmunofluorescencia en los glomérulos de los pacientes con MN idiopática son de la subclase IgG4. Aquí se encontró que los anticuerpos IgG en el suero de pacientes con MN idiopática que reaccionaron con PLA2R fueron también de la subclase IgG4. Se han confirmado además estas observaciones en el suero adicional de 6 pacientes diagnosticados con MN idiopática. El extracto glomerular humano (HE) se electrotransferió inicialmente con

muestras de suero de seis pacientes con MN idiopática (de MN1 a MN6), seguido por anticuerpos de carnero específico para cada subclase de IgG humana (de 1 a 4), y se detectó con anticuerpo anti IgG de carnero conjugado con peroxidasa. La subclase IgG predominante que reaccionó con el antígeno nativo fue IgG4, con cantidades variables de reactividad visto para IgG1, IgG2, e IgG3. Se obtuvieron resultados idénticos con el uso de PLA2R recombinante en lugar de HGE (datos no mostrados). La respuesta de inmunoglobulina en la nefropatía membranosa es típico de una respuesta Th2, con un predominio de la subclase IgG4 (Kuroki, 2005, *Kidney Int* 68:302-310). Cuando cualquiera de las proteínas glomerulares humanas o rPLA2R se inmunoelectrotransfieren con suero del paciente MN adecuadamente reactivo, la subclase predominante detectada por WB es IgG4 (Figura 3B), mientras que es IgG2 para un antígeno bacteriano no relacionado.

#### *Ubicación glomerular del receptor de la fosfolipasa A2*

El mecanismo patógeno propuesto para MN humana es que los autoanticuerpos se unen in situ a un antígeno presente en el podocito. Debido a que PLA2R se ha descrito en una forma soluble, primero descartamos la posibilidad de que los complejos circulantes anticuerpo-PLA2R estuvieran siendo atrapados en GBM. Ni los sueros MN ni los sueros control tuvieron ningún PLA2R detectable, aun después del enriquecimiento por medio de unión a lectina (datos no mostrados). Ni se puede detectar complejos inmunes circulantes de PLA2R-IgG ya sea a través de la precipitación con polietilenglicol 6000 o inmunoprecipitación de IgG con proteína G en muestras de suero de ninguno de los grupos. Por el contrario, hemos sido capaces de detectar la presencia de PLA2R en podocitos mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-PLA2R mono-específico. Las secciones congeladas de corteza de riñón humano normal se co-tiñeron con anti-agrina seguido por un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con FITC, para etiquetar la membrana basal glomerular (GBM) y anti-PLA2R seguido por el anticuerpo secundario anti-conejillo de indias conjugado con CY3 (datos no mostrados). Se encontró que la señal de PLA2R está claramente presente externo a GBM, y se localiza tanto para el cuerpo celular como los procesos de los podocitos. Esta tinción se reduce notablemente cuando el anticuerpo se aclara previamente con un fragmento recombinante de PLA2R que contiene los dominios 4-6 CRD (datos no mostrados). El patrón de tinción es granular, y se extiende a partir del cuerpo celular hasta los procesos basales. Cuando las criosecciones se tiñen mediante inmunofluorescencia doble con anticuerpos contra PLA2R y agrina, un componente de la membrana basal glomerular (GBM), la señal del podocito se ve claramente inmediatamente adyacente y externa a GBM. La mayoría de la tinción de PLA2R glomerular y de podocito se pueden bloquear mediante preincubación de los anticuerpos con fragmentos PLA2R recombinantes que contienen CTLDs 4, 5 y 6.

Seguidamente se estudió la localización de la IgG4 anti-PLA2R en el glomérulo. El PLA2R está presente en un patrón granular en muestras de biopsia de nefropatía membranosa y colocaliza con IgG4. Una sección congelada de una muestra de biopsia de un paciente diagnosticado con MN revela PLA2R y IgG4 que colocaliza bien en las paredes de los capilares periféricos y GBM (datos no mostrados). Una sección en serie del mismo paciente se tiñe de la misma manera, aunque el anticuerpo anti-IgG4 se omitió para excluir la posibilidad de que el anticuerpo secundario anti-carnero fue IgG detector en burro o conejillo de indias, o que el sangrado a través del canal de Cy3 provocara la señal vista anteriormente. En contraste con los podocitos, las células mesangiales del tejido de riñón humano normal no mostraron tinción para PLA2R (datos no mostrados).

Los estudios en el modelo de nefritis de Heymann en ratas han sugerido que el "taponamiento y derramamiento" de complejos receptor-anticuerpo se depositan subepitelialmente en el GBM, y anticiparon que lo mismo es cierto en el caso de PLA2R en MN humana PLA2R está presente en un patrón granular fino que recubre el GBM tras la inmunofluorescencia de secciones criogénicas de muestras de biopsia de riñón obtenidos de pacientes con MN. Este se puede bloquear con el fragmento de bloqueo de PLA2R recombinante. Aunque la intensidad de la tinción varió entre cuatro pacientes las muestras se examinaron, todas revelaron el mismo patrón granular para PLA2R (datos no mostrados). De interés, la tinción PLA2R del cuerpo de la célula de podocito, que había sido fuerte en las secciones normales glomerulares, se atenuó en gran medida en las muestras de biopsia de MN. Por otra parte, el patrón de tinción GBM coincidió estrechamente igual que el de IgG4 en doble inmunofluorescencia.

La microscopía de inmunofluorescencia mostró que anti-PLA2R e IgG4 se co-localizan en los glomérulos de los pacientes con MN idiopática pero no MN asociado a lupus. Para confirmar que la IgG en los glomérulos de los pacientes con nefropatía membranosa fue reactivo con PLA2R, se eluyeron IgG de las muestras de biopsia y usaron en la transferencia (de tipo) Western con PLA2R nativa y recombinante. IgG se eluyó con éxito a partir de cuatro muestras de biopsias de pacientes con nefropatía membranosa idiopática, uno de pacientes con nefropatía membranosa de lupus, y dos de los pacientes con nefropatía por IgA. La IgG eluida de las muestras de pacientes con nefropatía membranosa idiopática detecta específicamente el tamaño adecuado.

Las bandas PLA2R en el extracto glomerular y lisados celulares humanos fueron positivas para PLA2R recombinante (Figura 4A y 4B), mientras que no lo hacen la IgG eluidas de las otras tres muestras de pacientes con enfermedad glomerular por complejo inmune. La IgG se eluyó de biopsias de pacientes con MN idiopática (MN), MN por lupus (LMN), o nefropatía por IgA (nefropatía por IgA). Esta IgG eluida se usó para inmunoelectrotransferir el extracto glomerular humano (HGE) o PLA2R recombinante (rPLA2R).

*Asociación con la actividad de la enfermedad*

5 Se obtuvieron muestras de suero en serie cuando fue posible, y examinaron el cambio en la reactividad en varios individuos que han logrado tratamiento o remisión espontánea o, alternativamente, recaída. La presencia de autoanticuerpos a PLA2R, generalmente, es paralela a la actividad de la enfermedad clínica significativa, según se mide por la proteína urinaria y albúmina de suero (Figura 5 y 6 ). Es importante destacar que una disminución o desaparición del anticuerpo anti-PLA2R se pueden ver antes de la desaparición de la proteinuria. Esto es comprensible teniendo en cuenta el tiempo necesario para el aclaramiento de los depósitos inmunes y recuperación de la arquitectura del podocito y diafragmas en hendidura funcional.

15 Se han estudiado pacientes adicionales antes y después de la remisión inducida por el tratamiento Se encontró que los pacientes que fueron positivos para anti-PLA2R antes del tratamiento se volvieron negativo después de que la remisión se indujo con tratamiento inmunosupresivo (Figura 6A y B). Los cuadrados rellenos en el gráfico representan la excreción de proteína en la orina. Después de que se inició el tratamiento con ciclofosfamida y prednisona, la excreción de proteína en la orina disminuyó y la reactividad a PLA2R desapareció como se muestra en la Membrana de Western. Se han encontrado resultados similares en pacientes tratados con rituximab y ACTH sintética.

20 Estos hallazgos apoyan la utilidad de usar un inmunoensayo para PLA2R no sólo para el diagnóstico de MN, sino también para el seguimiento de actividad de la enfermedad durante el tratamiento o en espera de una remisión espontánea.

25 En conclusión, hemos identificado el receptor de fosfolipasa A2 tipo M como el principal antígeno objetivo en la enfermedad glomerular autoinmune, nefropatía membranosa idiopática. La proteína está presente en los podocitos humanos normales, y más del cincuenta por ciento de los pacientes con anticuerpos portan MN reactivo con esta proteína. Además, la proteína está presente dentro de los depósitos inmunes en las muestras de biopsia de los pacientes. Los niveles de anticuerpo contra PLA2R parecen correlacionar con la actividad de la enfermedad, y pueden resultar ser un método útil para el diagnóstico inicial de MN y para el seguimiento de la actividad de la enfermedad con el tratamiento o mientras se espera la remisión espontánea.

30 La discusión de las referencias en la presente descripción establece lo que afirman sus autores, y los solicitantes se reservan el derecho a impugnar la exactitud y pertinencia de los documentos citados .

**EJEMPLO 2**

35 Los niveles de auto-anticuerpos anti-PLA2R descrito en la presente descripción se pueden también determinar usando tiras de prueba como se ilustra en las Figuras. 8-9. En la tira de prueba, la membrana se divide en tres regiones distintas: una posición de la muestra (S) en un extremo de la membrana, una posición de prueba (T) situado en el centro de la membrana, y una posición de control (C) encontrada en el extremo opuesto de la membrana (Figura 8A). Se sitúa en S una cantidad en exceso de PLA2R deshidratado. El PLA2R se pueden conjugar con perlas de oro coloidal o perlas de látex para fines de visualización. En T, existe una cantidad en exceso de anti-IgG inmovilizado en la membrana. En C, existe otro anticuerpo anti-PLA2R inmovilizado (Figura 8A).

45 La cantidad en exceso de PLA2R deshidratado en la posición S es tal que cuando se aplica una muestra (por ejemplo, suero) en S, se forman complejos anticuerpo anti-PLA2R y PLA2R y los PLA2R libres están todavía disponibles para unir el anti-PLA2R inmovilizado en la posición C.

50 La posición S es donde se aplica una muestra de suero. Las puntas de las flechas delimitan el límite demarcación que el suero de la muestra no debe cruzar sobre la membrana cuando se aplica el suero a la membrana. El agua en el suero rehidrata la PLA2R. Un complejo anticuerpo-proteína se produce cuando el auto-anticuerpo reactivo a PLA2R forma un complejo con el PLA2R rehidratado. Una mezcla de los complejos anticuerpo-proteína y PLA2R no acoplado se mueve por acción capilar lejos de la posición S hacia la posición T y C.

55 Al llegar a la posición T, el complejo proteína-anticuerpo unirá el anticuerpo anti-IgG inmovilizado y se inmovilizará en la posición T. La concentración localizada del complejo anticuerpo-proteína que se marca con perlas de oro coloidal o látex se volverá visible como una línea de color en la posición T (Figura 9, medio). Mientras mayor la cantidad de auto-anticuerpos en la muestra, más ancha la banda visible en T. Cuando el área queda clara en la T posición, esto significa que existen auto-anticuerpos anti-PLA2R (Figura 9, izquierda). En la posición C el PLA2R libre y marcado se unirá y capturará por el anticuerpo anti-PLA2R inmovilizado. Esto, a su vez resultará en una concentración de un PLA2R marcado con perla coloidal de oro o de látex en la posición C y se volverá visible como línea de color en la posición C. El resultado de la posición C sirve como un control de prueba que existe PLA2R funcional en el material de prueba y siempre debe estar presente (Figura 9, derecha).

La tira de prueba se puede diseñar en una forma de una tira de prueba con varilla graduada (Figura 8B). Como una tira de prueba con varilla graduada, la tira se sumerge en una muestra de suero en el extremo de la posición S con el nivel de la muestra que no exceda el límite demarcación. La tira se pone después horizontalmente con la superficie de la membrana hacia arriba en una superficie plana. Se da una cantidad fija de tiempo para la re-hidratación del anticuerpo, acción capilar, y para que tenga lugar la reacción de unión del anticuerpo. Al final de tiempo fijo, debe haber bandas visibles en la posición C y en función del nivel de auto-anticuerpo anti-PLA2R, puede o no estar una banda visible en la posición T (Figura 9).

### 10 EJEMPLO 3

Los niveles de auto-anticuerpos anti-PLA2R descrito en la presente descripción se pueden determinar usando un ensayo ELISA como se ilustra en la Figura 10. Un ensayo ELISA comprende realizar un ensayo de titulación estándar y un ensayo de la muestra para determinar la cantidad de auto-anticuerpos anti-PLA2R en una muestra obtenida de un sujeto. Como se muestra, la placa de microtitulación del ensayo ELISA consiste de dos filas de referencia duplicados para cantidades crecientes de proteína IgG. Las cantidades estándar de proteína IgG que van desde 0-50 ng/ml pg se colocan en las filas de referencia para crear una curva estándar para la IgG humana. Las cantidades excesivas de PLA2R se inmovilizan en los pocillos de muestras de la placa. La muestra de suero se coloca en los pocillos de muestra. Posteriormente, se añade a los pocillos un anticuerpo anti-IgG humano marcado con peroxidasa de rábano picante. Las mezclas en los pocillos se dejan incubar a temperatura ambiente durante 90 min y se decanta el líquido. Los pocillos se lavan cinco veces con agua desionizada. Después, una alícuota de reactivo de 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina (TMB) se añade a cada pocillo. La mezcla se mezcló suavemente durante 10 segundos y se incubó a temperatura ambiente (18-25°C) durante 20 minutos. La reacción enzimática se termina mediante la adición de HCl 1N. Se lleva a cabo agitación suave hasta que todo el color azul cambie a color amarillo completamente. La cantidad de color del subproducto se determina mediante la lectura de su absorbancia a 450 nm con un lector de pocillos de microtitulación. La  $A_{450}$  corresponde a la cantidad de anticuerpos IgG humanos en los pocillos. La cantidad de los auto-anticuerpos anti-PLA2R en una muestra de prueba se puede estimar desde la  $A_{450}$  obtenida de los pocillos de muestra y la curva estándar obtenida de los pocillos de referencia.

En una modalidad alternativa, se puede usar el ensayo ELISA modificado como se muestra en la Figura 11. Como se muestra en la Figura 10, las filas de referencia y los pocillos de muestra se marcan (Figura 11). Las cantidades excesivas de PLA2R se inmovilizan en los pocillos de muestras de la placa. Una cantidad fija de IgG se coloca en pocillos de referencia por duplicado. Esta cantidad fija es el valor de referencia que corresponde a la cantidad promedio de los auto-anticuerpos anti-PLA2R encontrados en el suero de sujetos sanos no-MN. La muestra, suero, se coloca también en los pocillos de muestra por duplicado. La placa de ensayo es el proceso como se describe en la presente descripción. La  $A_{450}$  obtenida de los pocillos de muestra se comparan con los obtenidos para las filas de referencia correspondientes para determinar si existe un aumento o disminución en la cantidad de auto-anticuerpos anti- PLA2R en la muestra de suero.

Tabla 1 :

	<b>proteína</b>	<b>Número de Acceso</b>	<b>Tamaño (aa)</b>
5	Sulfato de condroitina proteoglicano 4	NP_001888.2	2322
	KIAA0960	NP_056019	1657
10	Receptor de fosfolipasa A2 tipo M	NP_031392.3	1463
	CD109, Gov sistema de aloantígeno plaquetario	NP_598000.2	1445
	Homólogo 2 de crumbs	NP_775960.4	1285
15	Nefrina	NP_004637.1	1241
	Integrina, subunidad alfa 1	NP_852478.1	1179
	Integrina, subunidad alfa 3	NP_002195.1	1051
20	Membrana alanina aminopeptidasa	NP_001141.2	967
	Aminopeptidasa A	NP_001968.3	957
	Integrina, beta 1 isoforma 1D	NP_391988.1	801
	Endopeptidasa neutra	NP_009218.2	750
25	Endoglina isoforma 2	NP_000109.1	625
	Isoforma 2 tipo Podocalixina	NP_005388.2	526
30			

La lista parcial de las proteínas glomerulares humanas se identifican mediante espectrometría de masas basado en los espectros de péptidos comunes con las regiones del gel de aproximadamente 200 kDa y 150 kDa . Las proteínas se arreglan de acuerdo a su tamaño previsto, dado en aminoácidos (aa). Las proteínas representan tanto las proteínas de podocitos (nefrina, alfa 3 integrina, endopeptidasa neutra) como proteínas endoteliales (endoglina).

40

45

50

55

60

LISTA DE SECUENCIAS

Precursor de la isoforma 2 isoforma de PLA2R humano NP\_001007268 (sec. con núm. de ident. 1)

5           1 mllspsl1111 lllgaprgca egvaaaltpe rllewqdkgi fviqseslkk ciqagksvlt  
61 lenckqankh mlwkwsnhg lfniggsgcl glnfsapeqp lslyecdsl vslrwrcnrk  
10          121 mitgplqysv qvahdntvva srkyihkwis ygsgggdice ylhkdlhtik gnthgmpcmf  
181 pfqynhqwhh ectregredd llwcattsry erdekwgfcg dptsaevgcd tiwekdlnsh  
241 icyqfnllss lswseahssc qmqqgtllsi tdeteenfir ehmsstvev wmglnqldeh  
15          301 agwqwsdgtg lnylnwspev nfepfvedhc gtfssfmpsa wrsrdestl pyickkylnh  
361 idheivekda wkyyathcep gwnpynrcy klqkeektwh ealrscqadn saliditsla  
421 eveflvtllg denasetwig lssnkipvsf ewsndssvif tnwhtlephi fpnrsqlcvs  
20          481 aeqseghwkv knceerlfyi ckkaghvlsd aesgcqegwe rhggficykid tvlrsfdqas  
541 sgyycppalv titnrfeqaf itslissvvk mkdsyfwial qdqndtgeyt wkpvqgkpep  
25          601 vqythwnthq prysggcvam rgrhplgrwe vkhcrhfkam slckqpvenq ekaeyeerwp  
661 fhpcyldwes epglascfkv fhsekvlmkr twreaeafce efgahlasfa hieeenfvne  
721 llhskfnwte erqfwigfkn rnplnagswe wsdrtpvvss fldntyfged arncavykan  
30          781 ktllplhcgk krewickipr dvkpkipfwy qyvpwlfyq daeylfhtfa sewlnfefvc  
841 swlhsdllti hsaheqefih skikalskyg aswwiglqee randefrwr d gtpviyqnwd  
901 tgrertvnnq sqrcgfissi tglwgseecs vsmpsickrk kvwliekkkd tpkqhgctcpk  
35          961 gwlyfnykcl llnipkdpss wknwthaqhf caeeggtlva ieseveqafi tmlfgqtts  
1021 vwiglqnddy etwlngkpvv ysnwspfdii nipshnttev qkhiplcall ssnpnfhftg  
40          1081 kwyfedcgke gygfvcemq dtsghgvnts dmypmpntle ygnrtykiin anmtwyaaik  
1141 tclmhkaqlv sitdqyhqsf ltvvlnrlgy ahwiglfttd nglndfwsdg tkssftfwkd  
1201 eessllgdcv fadsngrwhs tacesflqga ichvppetrq sehpelcset sipwikfksn  
45          1261 cysfstvlds msfeaahffc kkegsnllti kdeaenafll eelfafgssv qmwvlnaqfd  
1321 gnsk

50

55

60

ES 2 535 640 T3

NP\_031392.3 Precursor de la isoforma 1 del receptor 1 de la fosfolipasa humana A2 (sec. con núm. de ident. 2)

5  
 1 mllspslllll lllgaprgca egvåaaltp e rllwqdkgi fviqseslkk ciqagksvlt  
 61 lenckqankh mlwkwsnhg lfniggsgcl glnfsapeqp lslyecdsl vslrwrnrk  
 10 121 mitgplqysv qvahnrtvva srkyihkwis ygsgggdice ylhkdlhtik gnthgmpcmf  
 181 pfqynhqwhh ectregredd llwcattsry erdekwgfc dptsaevgcd tiwekdlnsh  
 15 241 icyqfnllss lswseahssc qmqggllsi tdeteenfir ehmsstvev wmglnqldeh  
 301 agwqwsdgtl lnylnwspev nfepfvedhc gtfssfmrsa wrsrdestl pyickkylnh  
 361 idheivekda wkyathcep gwnpynrncy klqkeektwh ealrscqadn saliditsla  
 20 421 eveflvtllg denasetwig lssnkipvsf ewsndssvif tnwhtlephi fpnrsqlcvs  
 481 aeqseghkwv knceerlfi ckkaghvlsd aesgcqegwe rhggficykid tvlrsfdqas  
 25 541 sgycppalv titnrfeqaf itslissvkv mkdsyfwial qdqndtgeyt wkpvqkpep  
 601 vqythwnthq prysggcvam rgrhplgrwe vkhcrhfkam slckqpveng ekaeyeerwp  
 661 fhpcyldwes epglascfv fhsekvlmkr twreaeafce efgahlasfa hieeenfvne  
 30 721 llhskfnwte erqfwigfkn rnpnagswe wsdrtpvvss fldntyfged arncavykan  
 781 ktllplhcgk krewickipr dvkkipfwy qydvplfyq daeylfhtfa sewlnfeyvc  
 841 swlhsdllti hsaheqefih skikalskyg aswwiglqee randefrwr dtpviyqnwd  
 35 901 tgrertvnnq sqrcgfissi tglwgseecs vsmpsickrk kwvliekkkd tpkqhgtcpk  
 961 gwlyfnykcl llnipkdpss wknwthaqhf caeeggtlva ieseveqafi tmnlfgqtts  
 40 1021 vwiglqnddy etwlngkpvv ysnwspfdii nipshnttev qkhiplcall ssnpnfhftg  
 1081 kwfycgcke gygfvekmq dtsghgvnst dmypmpntle ygnrtykiin anmtwyaaik  
 1141 tclmhkaqlv sitdqyhqsf ltvvlrnlgy ahwiglfttd nglndfwsdg tkssftfwkd  
 45 1201 eessllgdcv fadsngrwhs tacesflqga ichvppetrq sehpelcset sipwikfksn  
 1261 cysfstvlds msfeaahfc kkegsnllti kdeaenafll eelfafgssv qmvwlmaqfd  
 1321 gnnetikwfd gtptdqsnwg irkpdtdyfk phhcvalrip eglwqlspcq ekkgfickme  
 50 1381 adihtaealp ekpshsiip lavvltlivi vaictlsfci ykhnggfrr lagfrnpyyp  
 1441 atnfstvyle enilisdlek sdq

55

# ES 2 535 640 T3

NM\_007366.3 ARNm de precursor de la isoforma 1 del receptor 1 de la fosfolipasa humana A2 (sec. con núm. de ident. 4)

```

5      1 cccgagtgtc ggttcaactgt ggagacagcg gtggcggagt gggctctccag ggctctgggc
      61 tggcaaggcc cccggagggg gtggggcgcg gaggaggcta cggatccgct tccgcgcggc
10     121 ggggccgggt gcttgggacg cggctctggg ctcccgggat aaggggctcc cgggacaagg
      181 ggctcccgga gagcccagtg gttagcgatg ctgctgtcgc cgtcgctgct gctgctgctg
      241 ctgctggggg cggcggggg ctgcgccgag ggtgtggcgg cggcgcttac ccccgagcgg
15     301 ctcttgagggt ggcaggataa aggaatattt gttatccaaa gtgagagtct caagaaatgc
      361 attcaagcag gtaaatcggg tctgaccctg gagaactgca agcaagcaaa caagcacatg
      421 ctgtggaaat gggtttcaaa ccatggcctc tttaacatag gaggcagtgg ttgcctgggc
20     481 ctgaatttct ccgcccaga gcagccatta agcttatatg aatgtgactc caccctcgtt
      541 tccttacggg ggcgctgtaa caggaagatg atcacaggcc cgctgcagta ctctgtccag
25     601 gtggcgcgat acaacacagt ggtggcctca cggaagtata ttcataagtg gatttcttat
      661 gggtcaggtg gtggagacat ttgtgaatat ctacacaaag atttgcatac aatcaaaggg
      721 aacaccacg ggatgccgtg tatgtttccc ttccagtata accatcagtg gcatcatgaa
30     781 tgtaccctg aaggtcggga agatgactta ctgtggtgtg ccacgacaag ccgttatgaa
      841 agagatgaaa agtggggatt ttgccctgat cccacctctg cagaagtagg ttgtgatact
35     901 atttgggaga aggacctcaa ttcacacatt tgctaccagt tcaacctgct ttcattctctc
      961 tcttgagtg aggcacattc ttcattgccag atgcaaggag gtacgctggt aagtattaca
100    1021 gatgaaactg aagaaaattt cataagggag cacatgagca gtaaaacagt ggaggtgtgg
40    1081 atgggcctca atcagctgga tgaacacgct ggctggcagt ggtctgatgg aacgccgctc
      1141 aactatctga attggagccc agaggtaaatt tttgagccat ttggtgaaga tcaactgtgga
      1201 acatttagtt catttatgcc aagtgcctgg aggagtcggg attgtgagtc caccttgcca
45    1261 tatatatgta aaaaatatct aaaccacatt gatcatgaaa tagttgaaaa agatgcgtgg
      1321 aaatattatg ctaccactg tgagcctggc tggaatccct acaatcgtaa ttgctacaaa
50    1381 cttcagaaag aagaaaagac ctggcatgag gctctgcggt cttgtcaggc tgataacagt
      1441 gcattaatag acataacctc attagcagag gtggagtctt ttgtaacct ccttgagat
      1501 gaaaatgcat cagaacatg gattggtttg agcagcaata aaattccagt ttcctttgaa
55    1561 tggctaatg actcttcagt catctttact aattggcaca cacttgagcc ccacattttt
      1621 ccaaatagaa gccagctgtg tgtctcagca gagcagtctg agggacactg gaaagtcaaa
60

```

ES 2 535 640 T3

1681 aattgtgaag aaagactttt ttacatttgt aaaaaagcag gccatgtcct ctctgatgct  
 1741 gaatcaggat gtcaagaggg atgggagaga catggtggat tctggtacaa aattgacaca  
 5 1801 gtccttcgaa gctttgacca agcttccagc ggttattact gtcctcctgc acttgtaacc  
 1861 attacaaaca ggtttgaaca ggcttttatt accagtttga tcagtagtgt ggtaaaaatg  
 1921 aaggacagtt atttttggat agctcttcag gaccaaaatg atacgggaga atacacttgg  
 10 1981 aagccagtag ggcagaaacc cgagccgggtg cagtacacac actggaacac acaccagccg  
 2041 cgctacagtg gtggetgtgt tgccatgcca ggaaggcatc cacttggctg ctgggaagtg  
 2101 aagcactgtc ggcactttaa ggcaatgtcc ttgtgcaagc agccagtga aaatcaggaa  
 2161 aaagcagagt atgaagagag atggcccttt caccctgct atttggactg ggagtcagag  
 2221 cctggctctgg ccagttgctt caaggtattt catagtgaaa aagttctgat gaaaagaaca  
 20 2281 tggagagaag ctgaagcatt ttgcaagaa tttggagctc atcttgcaag ctttgcccat  
 2341 attgaggaag agaattttgt gaatgagctc ttacattcaa aatttaattg gacagaagaa  
 2401 aggcagttct ggattggatt taataaaaga aaccactga atgcccgtc atgggagtgg  
 25 2461 tctgatagaa ctctgttgt ctcttctgtt ttagacaaca cttattttgg agaagatgca  
 2521 agaaactgtg ctgtttataa ggcaaacaaa acattgctgc ccttacctg tggttccaaa  
 2581 cgtgaatgga tatgcaaat cccaagagat gtgaaacca agattcogtt ctggtaccag  
 30 2641 tacgatgtac cctggctctt ttatcaggat gcagaatacc tttttcatac ctttgccca  
 2701 gaatggttga actttgagtt tgtctgtagc tggctgcaca gtgatcttct cacaattcat  
 35 2761 tctgcacatg agcaagaatt catccacagc aaaataaaag cgctatcaa gtatggtgca  
 2821 agttggtgga ttggacttca agaagaaaga gccaatgatg aatttcgctg gagagatgga  
 2881 acaccagtga tataccagaa ctgggacaca ggaagagaaa gaactgtgaa taatcagagc  
 40 2941 cagagatgtg gctttatttc ttctataaca ggactctggg gtagtgaaga gtgttcagtt  
 3001 tctatgccta gtatctgtaa gcaaaaaag gtttgctca tagagaaaa gaaagataca  
 3061 ccaaaacaac atggaacgtg tcccaaagga tggctatatt ttaactataa gtgccttctg  
 45 3121 ctgaatatcc ccaaagacct aagcagttgg aagaactgga cgcctgctca acatttctgt  
 3181 gctgaagaag gggggaccct ggtcgccatt gaaagtgagg tggagcaagc tttcattact  
 3241 atgaatcttt ttggccagac caccagtgtg tggataggtt tacaaaatga tgattatgaa  
 50 3301 acatggctaa atggaagcc tgtggtatat tctaactggt ctccatttga tataataaat  
 3361 attccaagtc acaataccac tgaagttcag aaacacattc ctctctgtgc cttactctca  
 3421 agtaatccta attttcattt cactgaaaa tggatatttg aagactgtgg aaaggaaggc  
 55 3481 tatggggttg tttgtgaaaa aatgcaagat acttctggac acggtgtaaa tacatctgat  
 60

ES 2 535 640 T3

3541 atgtatocaa tgccaatac cttagaatat ggaaacagaa cttacaaaat aattaatgca  
 3601 aatatgactt ggtatgcagc aataaaaacc tgcctgatgc acaaagcaca actggtcagc  
 5 3661 atcacagacc agtatcacca gtccttcctc actgttgtcc tcaaccggct aggatatgcc  
 3721 cactggattg gactgttcac cacagataat ggtcttaatt ttgactggtc tgatggcacc  
 10 3781 aatccttctt tcactttttg gaaagatgag gagtcctccc tccttgggtga ctgctgtttt  
 3841 gccgacagca acggacgctg gcatagcaca gcctgcgagt ctttctgca aggtgccatt  
 3901 tgtcatgtgc cacctgaaac aagacaatct gaacaccag agttgtgctc agaaacatct  
 15 3961 attccctgga taaaatttaa aagtaattgc tacagttttt ctacagtctc agacagtatg  
 4021 agttttgagg ctgctcatga attttgcaaa aaggaagggt ctaatctttt aacaatcaag  
 20 4081 gatgaggctg aaaatgcatt tctoctagaa gagctgtttg cttttgggtc ttctgtccag  
 4141 atggtttggt tgaatgctca atttgatggt aacaatgaaa ccataaagtg gtttgatgga  
 4201 actcccacag accagtcaaa ctggggcatt cgggaagccag acacagacta cttcaagccc  
 25 4261 catcattgtg ttgccttgag gatccctgaa ggattatggc agctatcccc gtgtcaagaa  
 4321 aaaaaggct ttatatgtaa aatggaggca gatattcaca ctgcagaggc gctgccagaa  
 30 4381 aaaggaccaa gtcacagcat cattcctctt gcggttgtac tgacactgat agtcattgtg  
 4441 gccatttgca cactttcctt ctgcatatac aagcataacg gtggcttctt caggagactt  
 4501 gcagggtttc ggaatcctta ctatcctgca accaacttta gtacagtata tttagaagaa  
 35 4561 aatattctca tttctgatct tgagaagagt gaccaataat aatgagggtca gagaatgcca  
 4621 cagacaccag ggtaagtaaa gaagactaaa caggagtctc atctgtcttt ccctttacag  
 4681 cacagatgcc attagaatgt gaattgggtc actatthtaa ttattcttga agtgattact  
 40 4741 ggttttgaat cttaaccaa tcagatgggt tttgatttat tcatttcctt aaactgtgat  
 4801 ccattcttaa aaggggtaaa ttatgcattg gttatthttc agaaagacaa gaactattaa  
 45 4861 aagaaactcc ctattg

50

55

60

# ES 2 535 640 T3

NM\_001007267 ARNm del precursor de la isoforma 2 del receptor 1 de la fosfolipasa humana A2 (Sec. con núm. de ident. 3)

```

5           1 cccgagtgtc ggttcactgt ggagacagcg gtggcggagt gggctctccag ggctctgggc
           61 tggcaaggcc cccggagggg gtggggcgcg gaggaggcta cggatccgct tccgcgcggc
10          121 ggggccgggt gcttgggacg cggctctggg ctcccgggat aaggggctcc cgggacaagg
           181 ggctcccgga gagcccagtg gttagcgatg ctgctgtcgc cgtcgctgct gctgctgctg
           241 ctgctggggg cggcgcgggg ctgcgccgag ggtgtggcgg cggcgcttac ccccgagcgg
15          301 ctcttgagtg ggcaggataa aggaatattt gttatccaaa gtgagagtct caagaaatgc
           361 attcaagcag gtaaatcggg tctgacctg gagaaactgca agcaagcaaa caagcacatg
20          421 ctgtggaaat gggtttcaaa ccatggcctc ttaacatag gaggcagtgg ttgcctgggc
           481 ctgaatttct cgcgccaga gcagccatta agcttatatg aatgtgactc caccctcgtt
           541 tccttacggt ggcgctgtaa caggaagatg atcacaggcc cgctgcagta ctctgtccag
25          601 gtggcgcgatg acaacacagt ggtggcctca cggaagtata ttcataagtg gattttctat
           661 gggtcaggtg gtggagacat ttgtgaatat ctacacaaag atttgcatc aatcaaaggg
30          721 aacaccacg ggatgcogtg tatgtttccc ttccagtata accatcagtg gcatcatgaa
           781 tgtaccctg aaggtcggga agatgactta ctgtggtgtg ccacgacaag ccgttatgaa
           841 agagatgaaa agtggggatt ttgccctgat cccacctctg cagaagtagg ttgtgatact
35          901 atttgggaga aggacctcaa ttcacacatt tgctaccagt tcaacctgct ttcattcttc
           961 tcttgagtg aggcacattc ttcattgccag atgcaaggag gtacgctggt aagtattaca
40          1021 gatgaaactg aagaaaattt cataagggag cacatgagca gtaaaacagt ggagggtgtgg
           1081 atgggcctca atcagctgga tgaacacgct ggctggcagt ggtctgatgg aacgcccctc
           1141 aactatctga attggagccc agaggtaaat tttgagccat ttggtgaaga tcaactgtgga
45          1201 acatttagtt catttatgcc aagtgcctgg aggagtcggg attgtgagtc caccttgcca
           1261 tatatatgta aaaaatatct aaaccacatt gatcatgaaa tagttgaaaa agatgcgtgg
50          1321 aaatattatg ctaccactg tgagcctggc tggaatccct acaatcgtaa ttgctacaaa
           1381 cttcagaaag aagaaaagac ctggcatgag gctctgcggt cttgtcaggc tgataacagt
           1441 gcattaatag acataacctc attagcagag gtggagtttc ttgtaaccct ccttgagat
55          1501 gaaaatgcat cagaaacatg gattggtttg agcagcaata aaattccagt ttcctttgaa
           1561 tggctaatg actcttcagt catctttact aattggcaca cacttgagcc ccacattttt
60          1621 ccaaatagaa gccagctgtg tgtctcagca gagcagtctg agggacactg gaaagtcaaa

```

ES 2 535 640 T3

5 1681 aattgtgaag aaagactttt ttacatttgt aaaaaagcag gccatgtcct ctctgatgct  
 1741 gaatcaggat gtcaagaggg atgggagaga catggtggat tctgttacia aattgacaca  
 1801 gtccttcgaa gctttgacca agcttccagc ggttattact gtcctcctgc acttgtaacc  
 1861 attacaaaca ggtttgaaca ggcttttatt accagtttga tcagtagtgt ggtaaaaatg  
 10 1921 aaggacagtt atttttggat agctcttcag gaccaaagt atacgggaga atacacttgg  
 1981 aagccagtag ggcagaaacc cgagccggtg cagtacacac actggaacac acaccagccg  
 2041 cgctacagtg gtggctgtgt tgccatgcga ggaaggcatc cacttggctg ctgggaagtg  
 15 2101 aagcaactgtc ggcactttaa ggcaatgtcc ttgtgcaagc agccagttga aaatcaggaa  
 2161 aaagcagagt atgaagagag atggcccttt caccctgctt atttggactg ggagtcagag  
 20 2221 cctggtctgg ccagttgctt caaggtatct catagtgaat aagtctgat gaaaagaaca  
 2281 tggagagaag ctgaagcatt ttgcgaagaa tttggagctc atcttgcaag ctttgccat  
 2341 attgaggaag agaattttgt gaatgagctc ttacattcaa aatttaattg gacagaagaa  
 25 2401 aggcagllct ggallggall laataaaaga aaccactga atgcccgtc atgggagtg  
 2461 tctgatagaa ctctgttgt ctctctgttt tttagacaaca cttattttgg agaagatgca  
 2521 agaaactgtg ctgttfataa ggcaaacaaa acattgctgc cttactactg tggttccaaa  
 30 2581 cgtgaatgga tatgcaaat cccaagagat gtgaaacca agattccgtt ctggtaccag  
 2641 tacgatgtac cctggctctt ttatcaggat gcagaatacc ttttcatac ctttgctca  
 35 2701 gaatggttga actttgagtt tgtctgtagc tggctgcaca gtgatcttct cacaattcat  
 2761 tctgcacatg agcaagaatt catccacagc aaaataaaag cgctatcaa gtatggtgca  
 2821 agttggtgga ttggacttca agaagaaaga gccaatgatg aatttcgctg gagagatgga  
 40 2881 acaccagtga tataccagaa ctgggacaca ggaagagaaa gaactgtgaa taatcagagc  
 2941 cagagatgtg gctttatctt ttctataaca ggactctggg gtatggaaga gtgttcagtt  
 3001 tctatgccta gtatctgtaa gcgaaaaaag gtttggctca tagagaaaa gaaagataca  
 45 3061 ccaaaacaac atggaactgt tccaaagga tggctatatt ttaactataa gtgccttctg  
 3121 ctgaatatcc ccaaagacc aagcagttgg aagaactgga cgcatgctca acatttctgt  
 3181 gctgaagaag gggggaccct ggtcgcatt gaaagtgagg tggagcaagc tttcattact  
 50 3241 atgaatcttt ttggccagac caccagtgtg tggataggtt tacaaaatga tgattatgaa  
 3301 acatggctaa atggaaagcc tgtggtatat tctaactggt ctccatttga tataataaat  
 3361 attccaagtc acaataccac tgaagttcag aaacacattc ctctctgtgc cttactctca  
 55 3421 agtaatccta attttcattt cactggaaaa tggatatttg aagactgtgg aaaggaaggc  
 3481 tatgggtttg tttgtgaaaa aatgcaagat acttctggac acggtgtaa tacatctgat  
 60

ES 2 535 640 T3

3541 atgtatccaa tgcccaatac cttagaatat ggaaacagaa cttacaaaat aattaatgca  
3601 aatatgactt ggtatgcagc aataaaaacc tgctgatgac acaaagcaca actggtcagc  
5 3661 atcacagacc agtatcacca gtccttctc actgttgtcc tcaaccggct aggatatgcc  
3721 cactggattg gactgttcac cacagataat ggtcttaatt ttgactggtc tgatggcacc  
10 3781 aaatcttctt tcactttttg gaaagatgag gagtcctccc tccttgggta ctgcgTTTTT  
3841 gccgacagca acggacgctg gcatagcaca gcctgcgagt cttttctgca aggtgccatt  
3901 tgtcatgtgc cacctgaaac aagacaatct gaacaccag agttgtgctc agaaacatct  
15 3961 attccctgga taaaatttaa aagtaattgc tacagttttt ctacagtcct agacagtatg  
4021 agttttgagg ctgctcatga attttgcaaa aaggaagggt ctaatctttt aacaatcaag  
4081 gatgaggctg aaaatgcatt tctcctagaa gagctgtttg cttttgggtc ttctgtccag  
20 4141 atggtttggt tgaatgctca atttgatggt aacagtaagt gatttgggta gaggagagga  
4201 cataaataaa tacatggttg ttaaagctga tgataatggc atctgtgagc cagaaaactc  
25 4261 tccttggata cgTTTTctga gaaaaaatag catgaagcct aaagccattt cttccaaaaa  
4321 caacattgca acccttttct ttaccctttt gtcttttaa ataatcccag aacacaaaaa  
4381 ataaaaacaa acaataacat gtttatcttt acccttagca ggaagatgct tggctggaac  
30 4441 tttgtgttca cagacttagt cattgcatac caaaaccata tttactggaa aatatcccag  
4501 gtttctaata gttataaaag cacaatagag ttatggaaat gtttccatga tgaactgtgc  
35 4561 tgtaggatt cttatgtgct actcataaaa accagagttt gtaataaaat ggaagcatgg  
4621 tattcttttc tttatgtaat tgatggttat tgaaaggtag ttgtgaagaa aattatttta  
4681 attggtatgg agagcttgtt acagtggtgt accaagggtg ggggtgagcc taccctttcg  
40 4741 aggaggagta ttttaacac caacattggt tagaatttca agcagatggt gataataaaa  
4801 agcagaccaa cttttagtta gctgtattgt tagtttttaa ttattttcag acaatacact  
45 4861 attgccaca catgggatgg actctcctac cgcccctacc cccttggtag atggctggct  
4921 tggattataa gaaattcact gtaaaatctt tttagaaagt gagccatttt gtaatgatga  
4981 agatgttagg acttcaaagg atttttcttt actcgattag ttttgtttat caaatgattt  
50 5041 ctttaaatcg attatatata tatatggaat atttcaaaat tcaaactgtc acattaagaa  
5101 acatgataac ctaaatgacc taataaagaa cactgtacct aaaataaaga ggcaacttta

55

60

# ES 2 535 640 T3

Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de PLA2R humano (sec. con núm. de ident. 5):

5	1 MLLSPSLLLL LLLGAPRGCA EGVAALTP E RLLEWQDKGI FVIQSESLKK CIQAGKSVLT
	61 LENCKQANKH MLWKWVSNHG LFNIGGSGCL GLNFSAPEQP LSLYECDSTL VSLRWRCNRK
	121 MITGPLQYSV QVAHDNTVVA SRKYIHKWIS YGSGGGDICE YLHKDLHTIK GNTHGMPCMF
	181 PFQYNHQWHH ECTREGREDD LLWCATTSRY ERDEKWGFCE DPTSAEVEGCD TIWEKDLNSH
	241 ICYQFNLLSS LSWSEAHSSC QMQGGTLLSI TDETEENFIR EHMSSKTVEV WMGLNQLDEH
	301 AGWQWSDGTP LNYLNWSPEV NFEPFVEDHC GTFSSFMPSA WRSRDCESTL PYICKKYLNH
10	361 IDHEIVEKDA WKYYATHCEP GWNPNRNCY KLQKEEKTWH EALRSCQADN SALIDITSLA
	421 EVEFLVTLLG DENASETWIG LSSNKIPVSF EWSNDSSVIF TNWHTLEPHI FPNRSQLCVS
	481 AEQSEGHKVV KNCEERLFYI CKKAGHVLSD AESGCQEGWE RHGGFCYKID TVLRSFDQAS
	541 SGYYCPPALV TITNRFEQAF ITSLISSVVK MKDSYFWIAL QDQNDTGEYT WKPVGQKPEP
	601 VQYTHWNTHQ PRYSGGCVAM RGRHPLGRWE VKHCRHFAM SLCKQPVENQ EKAIEEERWP
15	661 FHPCYLDWES EPGLASCFKV FHSEKVLTKR TWREAEAFCE EFGAHLASFA HIEEENFVNE
	721 LLHSKFNWTE ERQFWIGFNK RNPLNAGSWE WSDRTPVVSS FLDNTYFGED ARNCAVYKAN
	781 KTLLEPLHCGS KREWICKIPR DVKPIPFYQ QYDVPWLFYQ DAELYFHTFA SEWLNFEFVC
	841 SWLHSDLLTI HSAHEQEFIH SKIKALSKYG ASWWIGLQEE RANDEFWRD GTPVIYQNW
	901 TGRERTVNNQ SQRCGFISSI TGLWGSEECV VSMPSICKRK KVWVLEKTKD TPKQHGTCPK
	961 GWLYFNYKCL LLNIPKDPSS WKNWTHAQHF CAEEGGTLVA IESEVEQAFI TMNLFQTTS
20	1021 VWIGLQNDY ETWLNKGPVV YSNWSPFDII NIPSHNTTEV QKHIPLCALL SSNPNFHFTG
	1081 KWYFEDCGKE GYGFVCEKMQ DTSGHGVNTS DMYPMPNTLE YGNRTYKII ANMTWYAAIK
	1141 TCLMHKAQLV SITDQYHQS F LTVVLNRLGY AHWIGLFTD NGLNFDWSDG TKSSFTFWKD
	1201 EESSLLGDCV FADSNRWH S TACESFLQGA ICHVPPETRO SEHPELCSET SIPWIKFKSN
	1261 CYSFSTVLDS MSFEAAHEFC KKEGSNLLTI KDEAENAFLL EELFAFGSSV QMVWLNQFD
25	1321 DETIKWFDGT PTDQSNWGIR KPDTDYFKPH HCVLRIP EG LWQLSPCQEK KGFICKMEAD
	1381 IHTAEALPEK GPSHS

30

Reivindicaciones

- 5 1. Un método para diagnosticar la nefropatía membranosa (MN) en un sujeto, el método que comprende detectar la presencia de anticuerpos que son reactivos a un receptor de fosfolipasa A2 (PLA2R), en donde los anticuerpos se encuentran en una muestra de un sujeto.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la MN es idiopática.
- 10 3. El método de la reivindicaciones 1 o 2, en donde el sujeto es un humano.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la muestra es una muestra de sangre.
- 15 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde los anticuerpos son de las subclases de IgG: IgG1-4.
- 20 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la detección se lleva a cabo por un inmunoensayo serológico.
- 25 7. El método de la reivindicación 6 en donde el inmunoensayo comprende:
  - a. medir un nivel de anticuerpos que son reactivos a un PLA2R en al menos dos muestras biológicas obtenidas de un paciente sujeto en diferentes momentos, en donde los diferentes tiempos son un primer intervalo de tiempo y un segundo intervalo de tiempo, en donde el segundo intervalo de tiempo es después del primer intervalo de tiempo, y en donde el paciente está en tratamiento por MN; y
  - 30 b. comparar los niveles de los anticuerpos en el al menos dos muestras biológicas, en donde una disminución en el nivel de los anticuerpos tomados en el segundo intervalo de tiempo en comparación con el primer intervalo de tiempo indica que el tratamiento es eficaz, en donde un aumento en el nivel de los anticuerpos tomados en el segundo intervalo de tiempo en comparación con el primer intervalo de tiempo indica que el tratamiento no es eficaz, y en donde cuando el nivel de anticuerpos en el segundo intervalo de tiempo disminuye por debajo de un límite de detección del inmunoensayo, indica que existe remisión.
- 35 8. El método de la reivindicación 6 en donde el inmunoensayo comprende:
  - a. medir un nivel de anticuerpos que son reactivos a un PLA2R en una muestra biológica obtenida de un paciente sujeto que presenta síntomas de la MN; y
  - 40 b. comparar el nivel de los anticuerpos en la muestra biológica con unos datos de control, en donde un aumento detectable en los anticuerpos que son reactivos a PLA2R en la muestra por encima de esos datos de control indica la probabilidad de MN.
9. El método de la reivindicación 7, en donde el tratamiento es un tratamiento inmunosupresivo.
- 45 10. Una composición para uso en el tratamiento de MN idiopática, la composición que comprende un PLA2R o fragmentos antigénicos de este.
11. El uso de una cantidad eficaz de PLA2R o fragmentos de este o un vector que expresa un PLA2R o fragmentos antigénicos de este en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de MN en un sujeto.
- 50 12. PLA2R o un fragmento antigénico de este, o un vector que expresa un PLA2R o fragmentos antigénicos de este para uso en el tratamiento de MN en un sujeto, que incluye MN idiopática.
- 55 13. Un inmunoensayo que comprende:
  - a. poner en contacto una muestra de un sujeto con un PLA2R o fragmento antigénico de este PLA2R;
  - b. formar un complejo anticuerpo-proteína entre el anticuerpo presente en una muestra con el PLA2R o fragmento antigénico de este PLA2R;
  - 60 c. lavar para eliminar cualquier anticuerpo no unido;
  - d. adicionar un anticuerpo de detección que se marca y es reactivo con el anticuerpo de la muestra;

e. lavar para eliminar cualquier anticuerpo de detección marcado no unido; y

f. convertir la etiqueta a una señal detectable, en donde la presencia de una señal detectable indica la probabilidad de MN, que incluye MN idiopática en el sujeto.

5

**14.** El inmunoensayo de la reivindicación 13, en donde la muestra es una muestra de sangre.

10

**15.** El inmunoensayo de cualquiera de la reivindicación 13, en donde el PLA2R o fragmento antigénico de este PLA2R se deposita o inmoviliza sobre un soporte sólido, y en donde el soporte está opcionalmente en el formato de una varilla graduada, una tira de prueba, una perla de látex, una microesfera o una placa de múltiples pocillos.

15

**16.** El inmunoensayo de cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en donde el anticuerpo de detección se marca mediante enlace covalentemente a una enzima, etiqueta con un compuesto fluorescente o metal, o etiqueta con un compuesto quimioluminiscente.

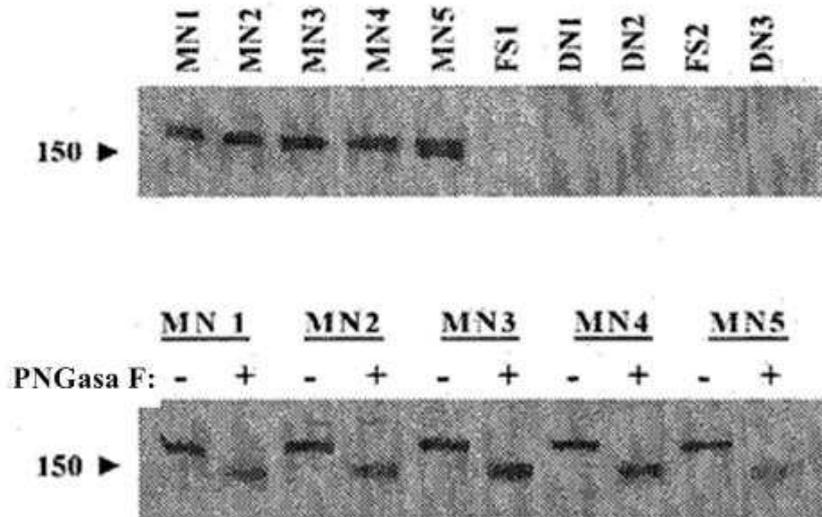
20

**17.** El inmunoensayo de cualquier de las reivindicaciones 13-16, en donde el anticuerpo de detección es específicamente reactivo con las especies del sujeto.

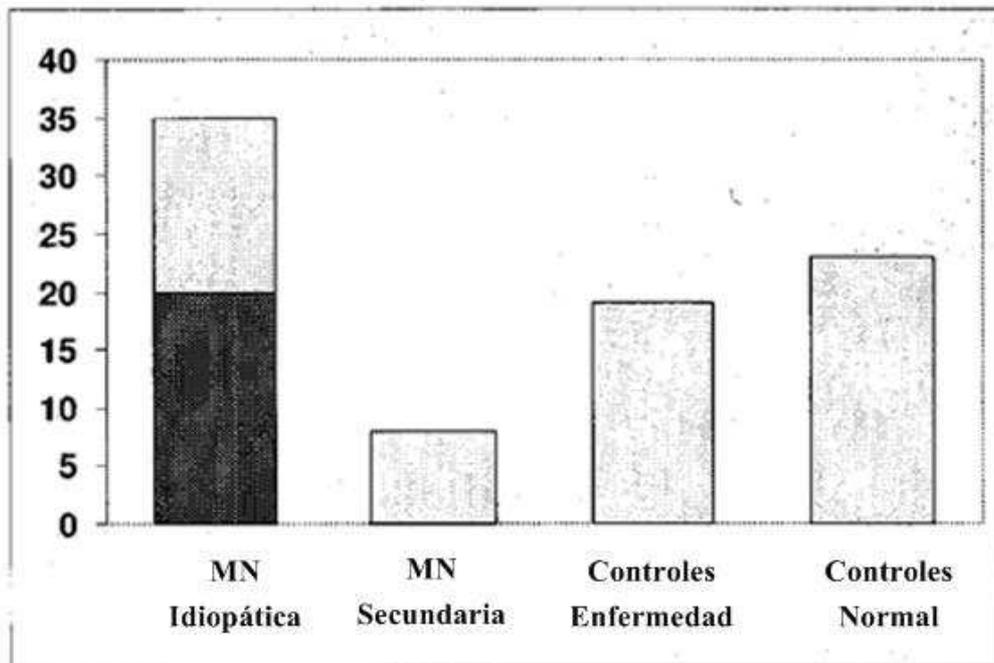
25

**18.** El inmunoensayo de cualquiera de las reivindicaciones 13-17, en donde la señal detectable se compara con un conjunto de señales detectables de una curva de titulación derivada de inmunoensayos de cantidades conocidas de PLA2R o fragmentos antigénicos en cantidad creciente.

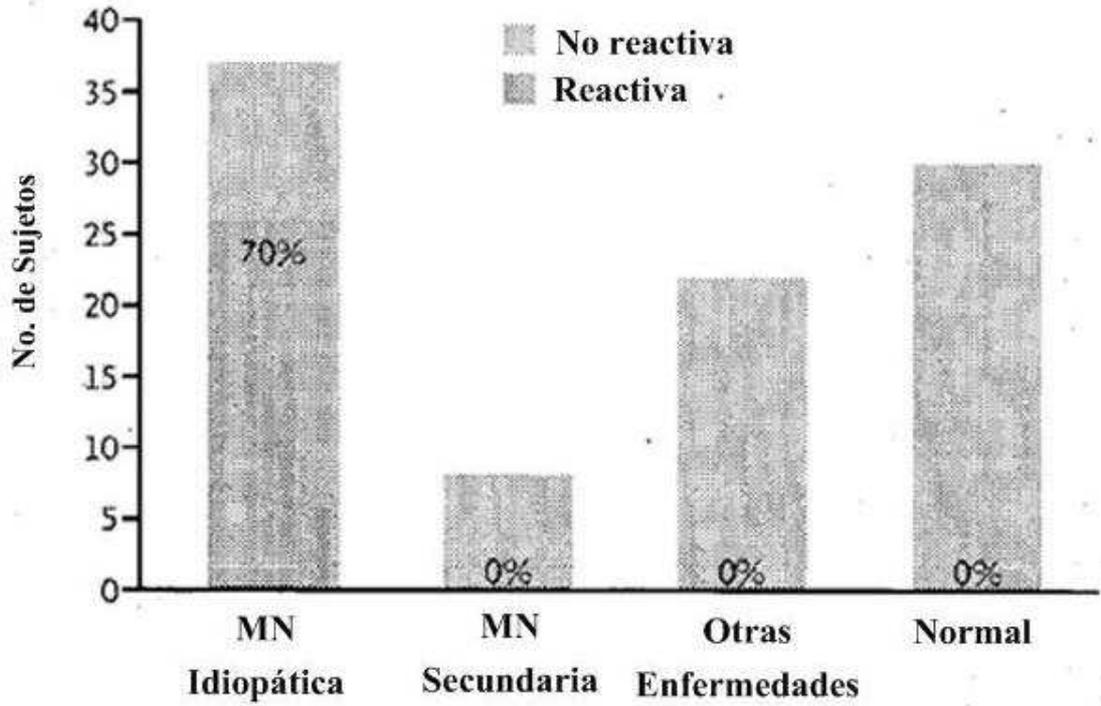
**Figura 1A**



**Figura 1B**

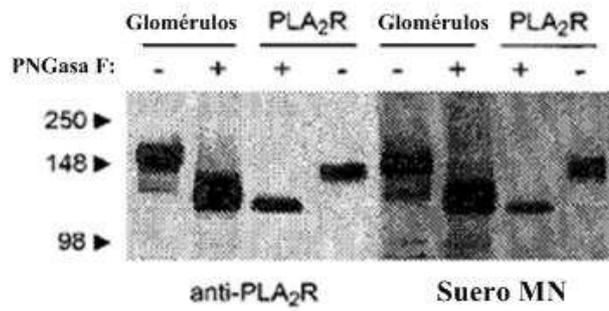


**Figura 1C**

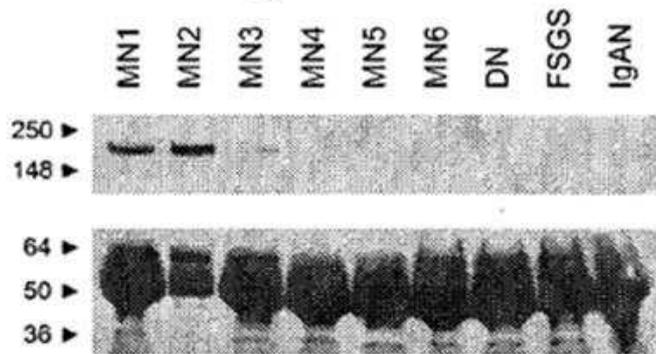


No. de sujetos	MN Idiopática	MN Secundaria	Otras Enfermedades	Normal
Suero reactivo	26	0	0	0
Suero no reactivo	11	8	22	30

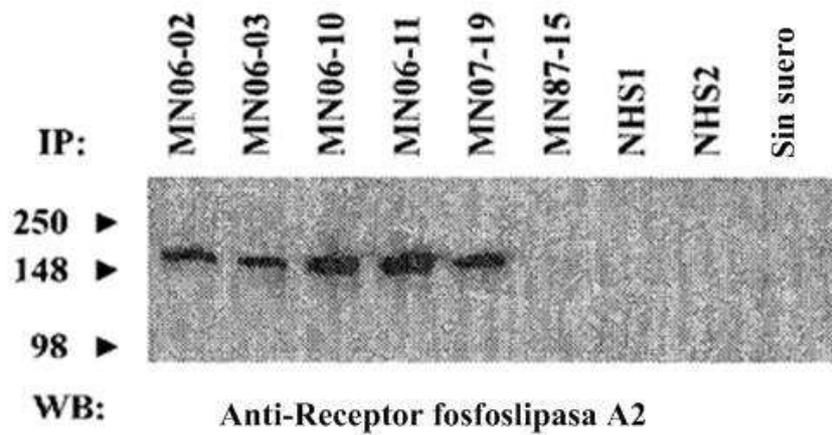
**Figura 2A**



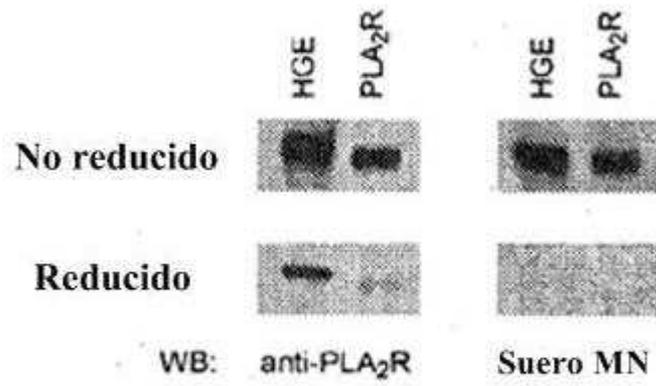
**Figura 2B**



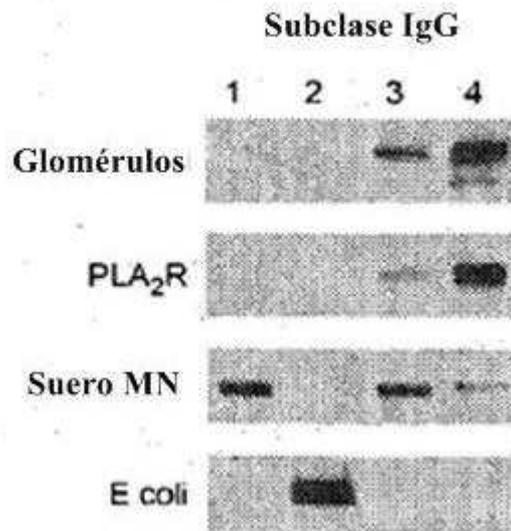
**Figura 2C**



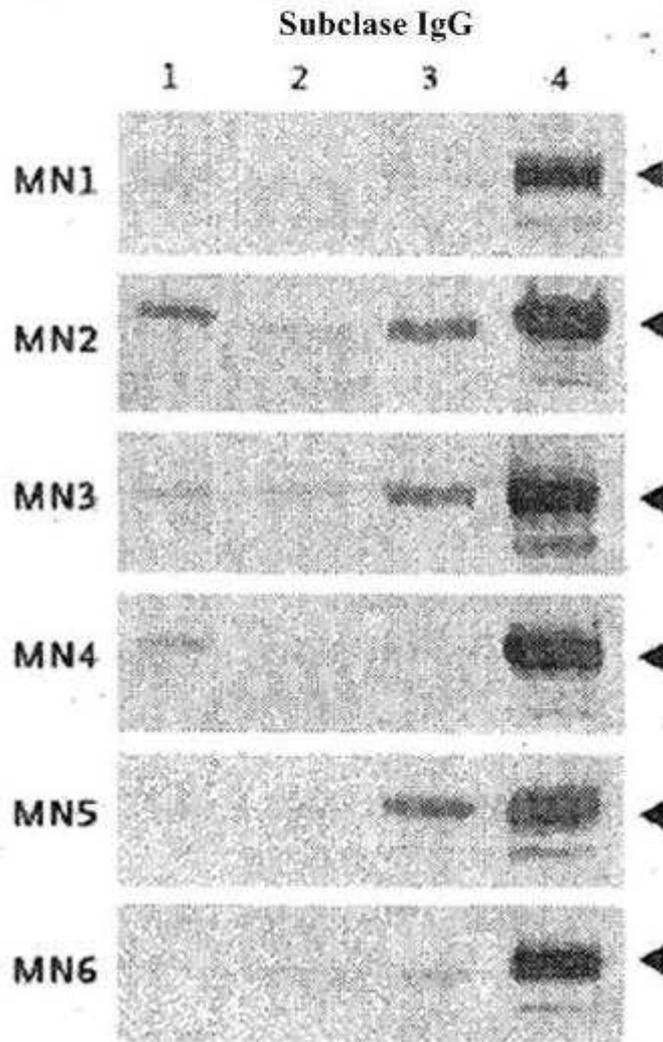
### Figura 3A



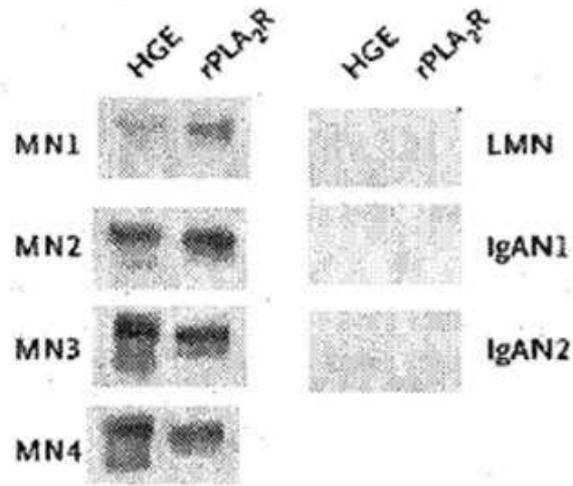
### Figura 3B



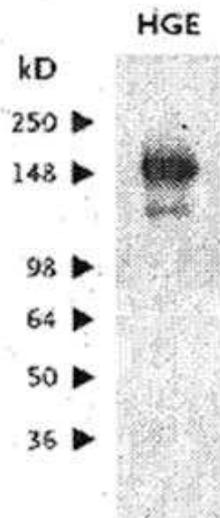
# Figura 3C



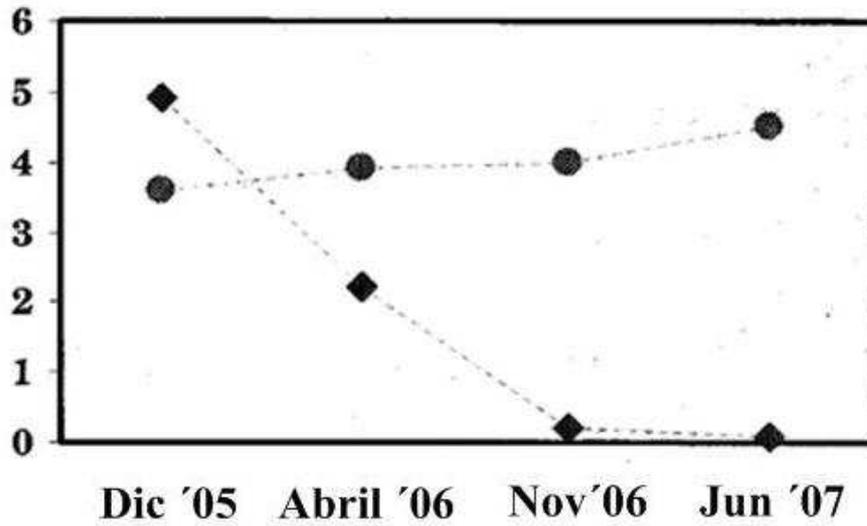
### Figura 4A



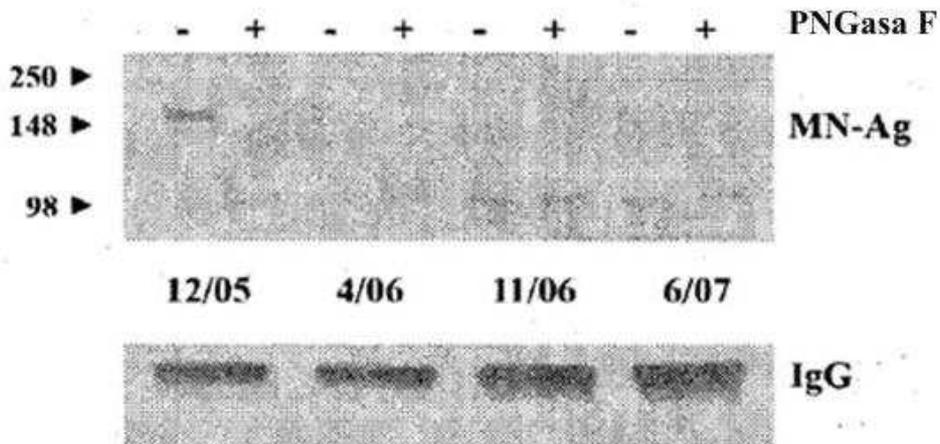
### Figura 4B



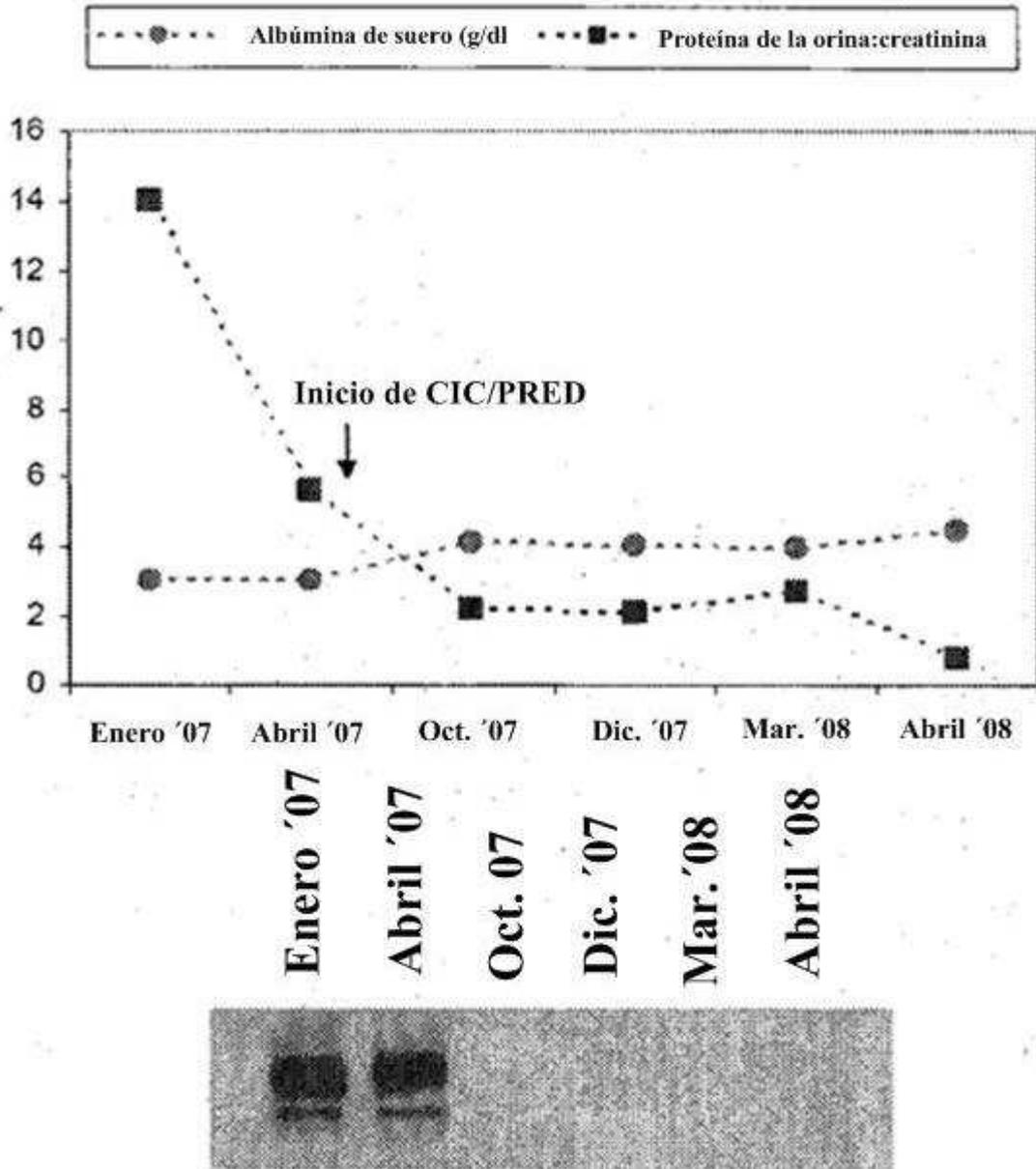
**Figura 5A**



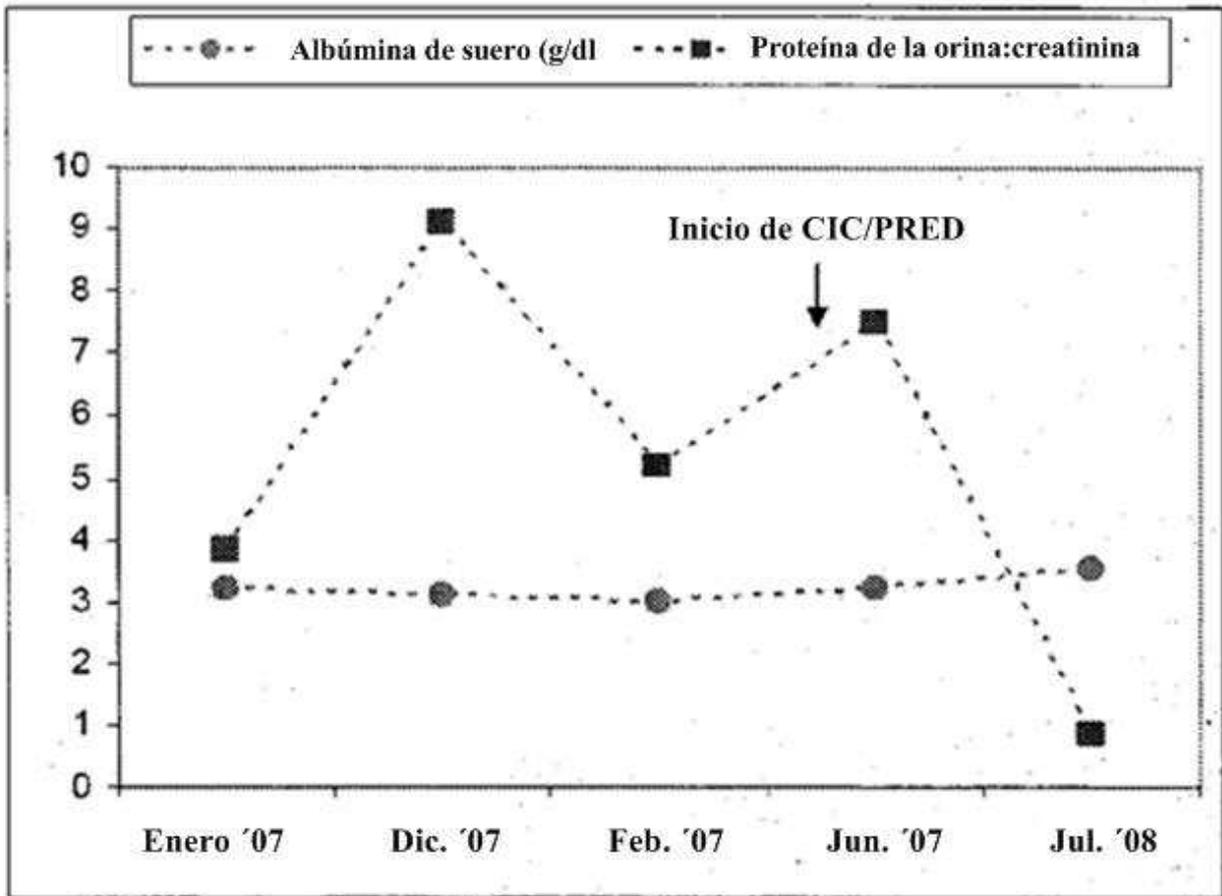
**Figura 5B**



# Figura 6A



**Figura 6B**



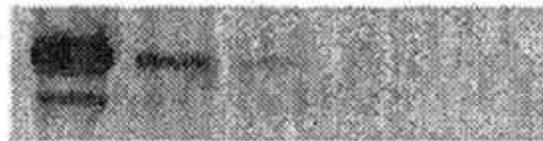
**Enero '07**

**Dic. '07**

**Feb. '08**

**Jun. '08**

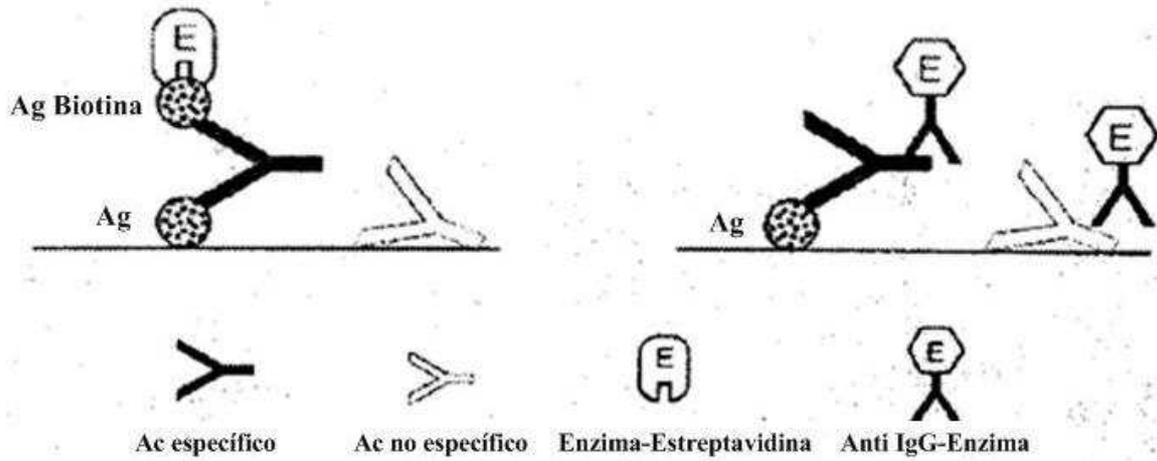
**Jul. '08**



## Figura 7

### a. ELISA de Sandwich-inverso

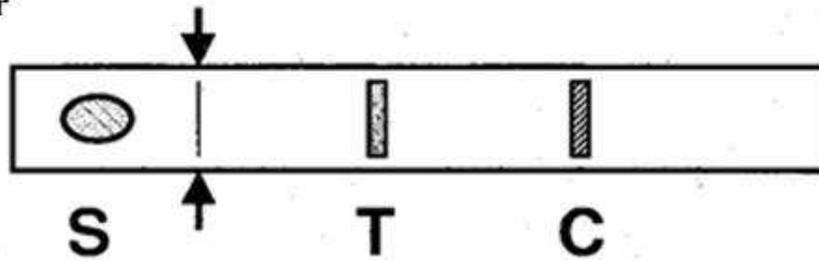
### b. ELISA indirecto



Principios diferentes para ensayos de anticuerpo mediante el RS-ELISA y el ELISA indirecto. Ac, anticuerpo; Ag, antígeno

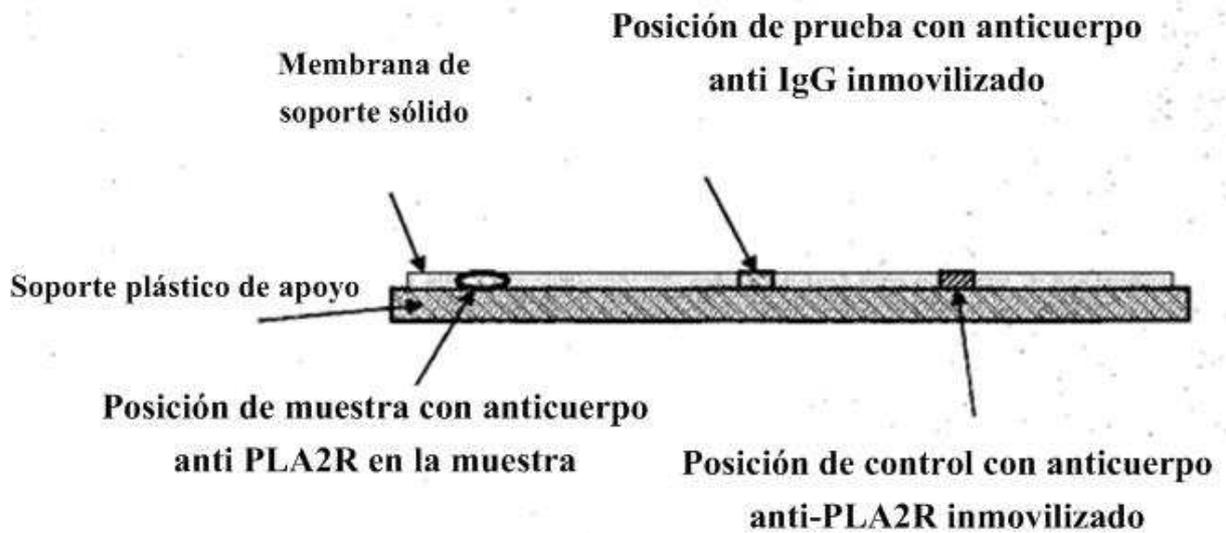
**Figura 8A**

Vista superior

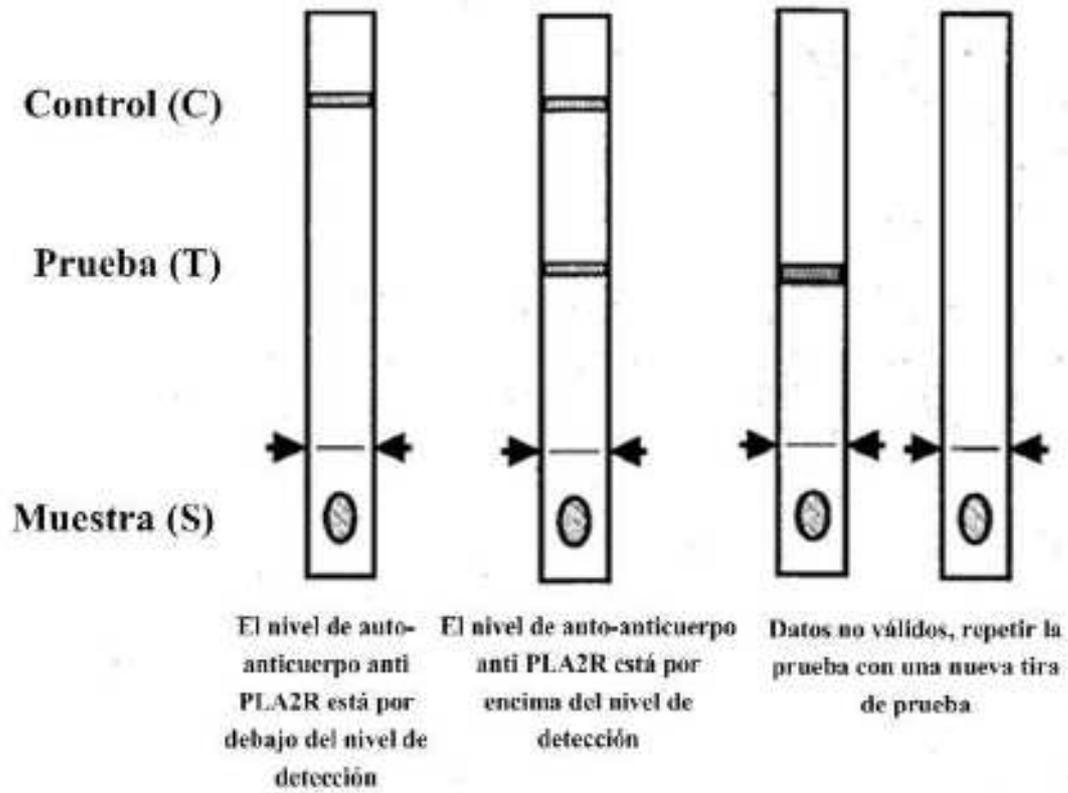


**Figura 8B**

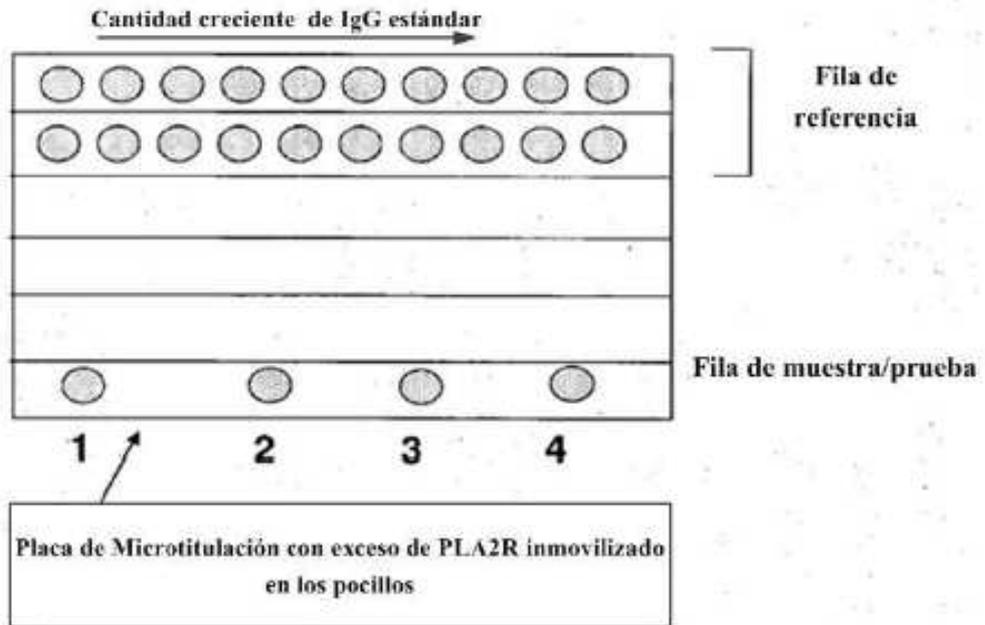
Vista transversal



**Figura 9**



**Figura 10**



**Figura 11**

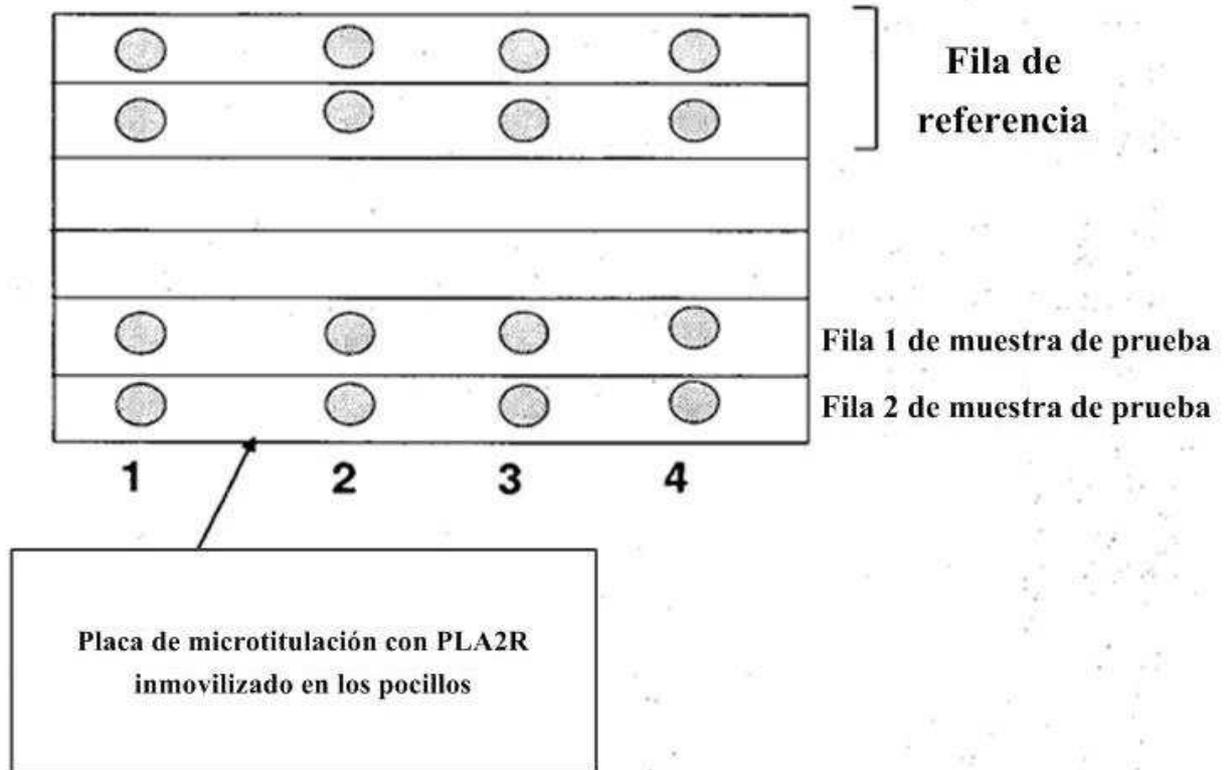
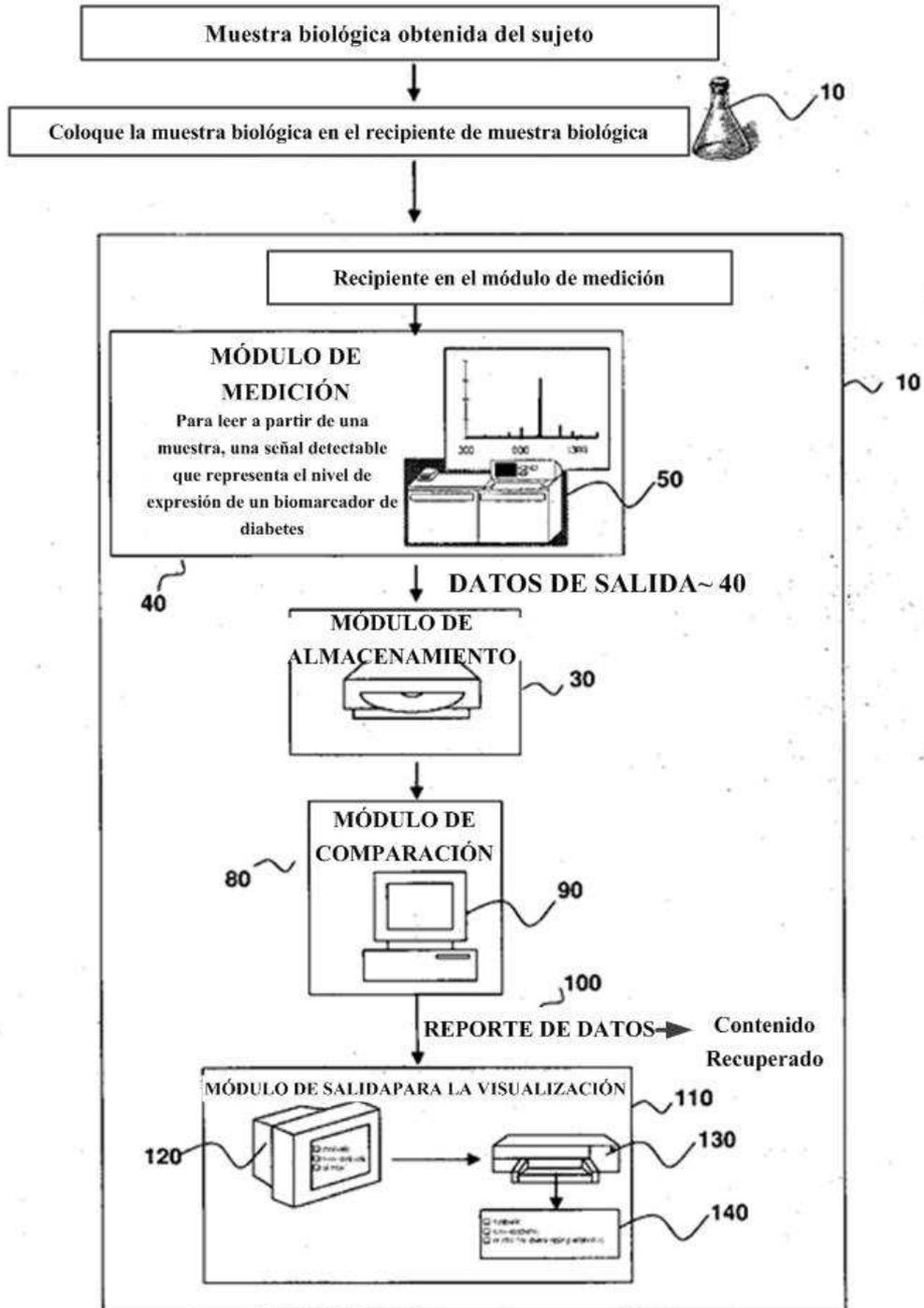


Figura 12



**Figura 13**

