

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 809**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/564** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2011 E 11711144 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 2534487**

54 Título: **Diagnóstico de lupus eritematoso sistémico**

30 Prioridad:

**12.02.2010 US 303691 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.02.2016**

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.  
(50.0%)  
At the Weizmann Institute of Science P.O. Box 95  
76100 Rehovot, IL y  
TEL HASHOMER MEDICAL RESEARCH  
INFRASTRUCTURE AND SERVICES LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**COHEN, IRUN R.;  
DOMANY, EYTAN;  
SHENTAL, NOAM y  
FATTAL, ITTAI**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 560 809 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).

**Diagnóstico de lupus eritematoso sistémico**

**Descripción**

5

**Área del invento**

[0001] Este invento se relaciona a métodos y botiquines para diagnosticar lupus eritematoso sistémico (SLE - systemic lupus erythematosus) en un sujeto. Particularmente, este invento se relaciona a un perfil específico de anticuerpos en la diagnosis de SLE en un sujeto.

10

**ANTECEDENTES DEL INVENTO**

[0002] El lupus eritematoso sistémico (SLE - systemic lupus erythematosus) es un trastorno inflamatorio autoinmune, que ocurre predominantemente en mujeres jóvenes. El SLE puede afectar muchos de los sistemas orgánicos del cuerpo, incluyendo los riñones, la piel, las articulaciones, el sistema nervioso, las membranas serosas, células y vasos sanguíneos. Aunque la causa específica del SLE es desconocida, varios factores son asociados con el desarrollo de la enfermedad, incluyendo factores genéticos, raciales, hormonales y ambientales.

15

[0003] El desarrollo de SLE es usualmente crónico, con recaídas e impredecible. SLEs sin tratamientos pueden ser fatales puesto que progresan desde un ataque a la piel y a las articulaciones a los órganos internos, incluyendo los pulmones, el corazón y los riñones, haciendo, por lo tanto, que una diagnosis temprana y precisa y/o una evaluación de riesgos del desarrollo del SLE sea particularmente importante. El SLE aparece principalmente como una serie de brotes, con períodos de intervención de una manifestación pequeña o sin manifestaciones de la enfermedad. El daño de los riñones, medido por el monto de proteínas en la orina, es una de las áreas más agudas del daño asociado con la patogenicidad del SLE, y da cuenta de por lo menos el 50% de la mortalidad y morbilidad de la enfermedad.

20

25

[0004] El SLE se caracteriza por la producción de autoanticuerpos inusuales en la sangre. Se ha demostrado que más de 100 auto-moléculas diferentes enlazan a autoanticuerpos en diferentes pacientes (Sherer et al., 2004, Semin. Arthritis (Artritis). Rheum. 34:501-37), formando complejos inmunológicos que circulan en la sangre y eventualmente se depositan en los tejidos. Estos depósitos de complejos inmunológicos causan una inflamación crónica y eventualmente daños del tejido. Los anticuerpos también tienen efectos patogénicos directos que contribuyen a una anemia hemolítica y trombocitopenia.

30

35

[0005] Comúnmente, un diagnóstico de SLE puede realizarse en base a 11 criterios definidos por el American College of Rheumatology (ACR - Universidad Americana de Reumatología). Estos criterios incluyen una irritación malar, una irritación discoide, fotosensibilidad, úlceras orales, artritis, serositis, trastornos renales, trastornos neurológicos, trastornos hematológicos (por ejemplo, leucopenia, linfopenia, anemia hemolítica o trombocitopenia), trastornos inmunológicos y anticuerpos anti-nucleares (ANA - anti-nuclear antibodies) (Tan et al., 1997, Arthritis (Artritis) Rheum 1997, 40:1725). Un sujeto puede ser diagnosticado clínicamente con SLE si cumple con por lo menos 4 de los 11 criterios. Sin embargo, el SLE todavía es posible aún en caso de que existan menos de los 4 criterios.

40

[0006] Mientras que los anticuerpos anti-nucleares y los autoanticuerpos anti dsADN, fosfolípidos y proteínas Sm están dentro de los 11 criterios utilizados para diagnosticar a SLE (Tan et al., 1997, Arthritis (Artritis) Rheum 1997, 40:1725), muchos pacientes diagnosticados con SLE no tienen estos autoanticuerpos, especialmente cuando ellos están en una remisión clínica.

45

[0007] Uno de los retos más difíciles en la administración clínica de enfermedades autoinmunes complejas tales como el SLE es la identificación precisa y temprana de la enfermedad en un paciente. Adicionalmente, ningún marcador diagnóstico confiable ha sido identificado para permitir a los trabajadores clínicos u otros el definir en una forma precisa los aspectos fisiopatológicos del SLE, la actividad clínica, la respuesta a la terapia o su prognosis.

50

El chip antigénico

55

[0008] Micro ensayos de antígenos son herramientas desarrolladas recientemente para la caracterización a alto caudal de la respuesta inmunológica (Robinson et al., 2002, Nat Med 8, 295-301), y han sido utilizados para analizar respuestas inmunológicas en vacunas y en trastornos autoinmunes (Robinson et al., 2002; Robinson et al., 2003, Nat Biotechnol. 21, 1033-9; Quintana et al., 2004; Kanter et al., 2006, Nat Med 12, 138-43). Se tiene la hipótesis, de que los patrones de varias reactividades podrían ser más reveladoras que relaciones simples entre antígenos y anticuerpos (Quintana et al., 2006, Lupus 15, 428-30) tal como se demostró en análisis previos de repertorios autoinmunes de ratones (Quintana et al., 2004; Quintana et al., 2001, J Autoimmun 17, 191-7) y de humanos (Merbl et al., 2007, J Clin Invest 117, 712-8; Quintana et al., 2003, J Autoimmun 21, 65-75) en salud y enfermedad. Por lo tanto, repertorios de autoanticuerpos tienen el

60

65

potencial de suministrar nuevos conceptos de la patogénesis de la enfermedad y sirven como bio-marcadores autoinmunes (Cohen, 2007, Nat Rev Immunol. 7, 569-74) del proceso de la enfermedad.

5 [0009] La publicación PCT número WO 02/08755 de algunos inventores de este invento es dirigida a un método, un sistema y una herramienta de fabricación para aglutinar y, por lo tanto, identificar antígenos pre definidos que reaccionan con inmunoglobulinas no determinadas del suero derivado de sujetos que son pacientes en necesidad del diagnóstico de la enfermedad o del monitoreo del tratamiento. La publicación '755 presenta el uso de ensayos de antígenos para identificar a antígenos que reaccionan con las inmunoglobulinas del suero derivado de sujetos que padecen de varias enfermedades. Además, se presentan métodos de diagnóstico y sistemas útiles para estos métodos, utilizando el paso de aglutinamiento de un subconjunto de antígenos de una pluralidad de antígenos, siendo dicho subconjunto de antígenos reactivos con una pluralidad de anticuerpos que son derivados de varios pacientes que tienen un sistema inmunológico deshabilitado y que sufren de una enfermedad y asocian o disocian a los anticuerpos de un sujeto con el aglutinamiento resultante.

15 [0010] La publicación de aplicación de patente de Estados Unidos número 2005/0260770 de algunos inventores de este invento presenta un sistema de ensayos de antígenos y sus usos diagnósticos. Esta aplicación suministra un método para diagnosticar una enfermedad inmunológica, y particularmente la diabetes de tipo uno, o una predisposición de estas en un sujeto, que comprende en determinar una capacidad de inmunoglobulinas del sujeto para enlazar específicamente cada sonda de antígenos de un conjunto de sondas de antígenos.

20 [0011] La publicación PCT número WO 10/128506 de algunos inventores de este invento se relaciona con los métodos para identificar el desarrollo de una enfermedad cardiovascular en un individuo, específicamente, para reconocer el desarrollo de un proceso de infarto agudo de miocardio (AMI – acute myocardial infarction) en un individuo. Li et al. presenta en Protein Clinical and Experimental Immunology (Clínica Proteínica e Inmunología Experimental) 147 (2006), 60-70 perfiles de autoanticuerpos de ensayos proteínicos para conceptos relacionados con SLE y síndromes del lupus incompletos.

25 [0012] En el artículo "Autoantigen microarray for multiplex characterization of auto-antibody responses" ("Micro Ensayos de Auto Antígenos para una Caracterización Múltiple de Respuestas de Autoanticuerpos") publicado en Nature Medicine (Medicina Natural) 8(3) (2002), 295-301, Robinson et al. habla acerca del uso de micro ensayos que contienen auto antígenos para la detección de anticuerpos que reconocen a dichos autoanticuerpos involucrados en diferentes enfermedades, tal como lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide.

30 [0013] No se ha presentado en la industria un ensayo de antígenos que pueda suministrar un ensayo específico, confiable, preciso y discriminatorio para diagnosticar a SLE. Aquellos ensayos discriminatorios tendrían un alto valor para la identificación de la presencia del SLE en pacientes o la discriminación de la susceptibilidad para desarrollar la enfermedad y para personalizar métodos terapéuticos adecuados para cada paciente.

35 [0014] Todavía existe la necesidad para métodos mejorados de diagnóstico y botiquines útiles para el diagnóstico de SLE en un sujeto.

## RESUMEN DEL INVENTO

40 [0015] Este invento suministra métodos para diagnosticar al lupus eritematoso sistémico (SLE - systemic lupus erythematosus) en un sujeto.

45 [0016] Este invento se basa en parte en los resultados inesperados obtenidos cuando se hacían pruebas de reactividad de anticuerpos de pacientes con SLE usando un ensayo de antígenos. El análisis resultó en la identificación de patrones únicos de reactividad de autoanticuerpos. Inesperadamente, los patrones únicos de autoanticuerpos persistieron independientemente de la actividad de la enfermedad y están presentes también en sujetos con remisiones clínicas a largo plazo (por ejemplo, sujetos en remisión renal). Ventajosamente, el patrón de reactividad mostró una alta sensibilidad y especificidad impresionantes para SLE. Además, un sujeto de control saludable que tuvo el patrón de anticuerpos de SLE se descubrió que posteriormente desarrolló un SLE clínico.

50 [0017] Por lo tanto, este invento suministra patrones únicos de reactividad de antígenos-autoanticuerpos relevantes a SLE. Mientras que algunos antígenos individuales (por ejemplo, el ácido hialurónico) fueron identificados por tener una suficiencia propia para diagnosticar adecuadamente a SLE, las combinaciones específicas de estos antígenos, tal como se detalló en la tabla 1 a continuación, fueron significativamente más precisos y confiables en la discriminación de patrones de SLE y en sujetos de control que cada antígeno por su propia cuenta.

55

60

65

Tabla 1-antígenos que discriminan a SLE y a controles de salud

	<b>Antígeno</b>	<b>IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:</b>	<b>Número CAS</b>
5	ácido hialurónico		9067-32-7
	CD99	IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1	
10	ADN de hebra doble (dsDNA - double strand DNA)		73049-39-5
	ADN de hebra simple (ssDNA - single strand DNA )		91080-16-9
15	virus de Epstein-Barr (EBV - Epstein-Barr virus)	IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2	
	mieloperoxidasa (MPO)	IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 3	
20	proteína enlazadora del factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGFBP-1 (Insulin-like growth factor binding protein-1)	IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 4	
	cardiolipina		383907-10-6
	colágeno tipo III (colágeno III)		9007-34-5
25	colágeno tipo IV (colágeno IV)		9007-34-5
	actina		51005-14-2
	proteína morfogenética ósea-4 (BMP4 - Bone morphogenetic protein-4)	IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 5	
30	CMV (CMV Pp150)	IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 6	
	F50	IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 7	
35	factor de crecimiento de hepatocitos (HGF - Hepatocyte Growth Factor)	IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 8	
40	HSP60p18	IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 9	
	Virus de la rubéola (RV - Rubella virus)	IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 10	
45	proteína enlazadora del calcio S100 A4 (S100A4)	IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 11	
	CITED 1	IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 12	
50	triada frágil de histidina (FHIT - Fragile Histidine Triad)	IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 13	
55			

**[0018]** De acuerdo al primer aspecto, este invento suministra un método para diagnosticar a lupus eritematoso sistémico (SLE - systemic lupus erythematosus) en un sujeto, que consiste en:

- 60 (i) Determinar la reactividad de los anticuerpos de IgG y de IgM en una muestra obtenida proveniente de un sujeto que tiene por lo menos 4 antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: IGFBP1, CD99, ácido hialurónico, EBV, ssDNA, dsDNA, MPO, cardiolipina, colágeno III, colágeno IV, actina, BMP4, CMV, F50, HGF, HSP60p18, RV, S100A4, CITED 1 y FHIT, determinando, por lo tanto, el patrón de reactividad de la muestra para la pluralidad de antígenos, y

65

(ii) Comparar el patrón de reactividad de dicha muestra con un patrón de reactividad de control, donde una reactividad incrementada de los anticuerpos IgG en relación a una pluralidad de antígenos seleccionados del grupo que consiste de: ácido hialurónico, EBV, ssDNA, dsDNA, BMP4, F50, HGF y HSP60p18, y/o una reactividad reducida de anticuerpos IgM en relación a una pluralidad de antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: IGFBP1, CD99, MPO, cardiolipina, colágeno III, colágeno IV, actina, CMV, RV, S100A4, CITED1 y FHIT en comparación con el patrón de reactividad de una muestra de control es una indicación que el sujeto padece de SLE.

**[0019]** En una sección, los antígenos comprenden por lo menos 5 antígenos. En otra sección, los antígenos comprenden por lo menos 6 antígenos. En otra sección, los antígenos comprenden por lo menos 7 antígenos. En otra sección, los antígenos comprenden por lo menos 8 antígenos. De acuerdo a una sección de ejemplo los antígenos son IGFBP1, CD99, ácido hialurónico, EBV, ssDNA, dsDNA, MPO, cardiolipina y colágeno III. Cada posibilidad representa una sección separada del invento.

**[0020]** Tal como se utiliza aquí, la "reactividad de los anticuerpos en una muestra" en relación a "una pluralidad de antígenos" se refiere a la reactividad inmunológica de cada anticuerpo en la muestra a un antígeno específico seleccionado de una pluralidad de antígenos. La reactividad inmunológica del anticuerpo hacia el antígeno, es decir, su capacidad para enlazarse específicamente al antígeno, puede utilizarse para determinar el monto de los anticuerpos en la muestra. Específicamente, de terminar la "reactividad de los anticuerpos IgG e IgM en una muestra" se refiere a la reactividad de por lo menos un anticuerpo IgG en la muestra en relación a un antígeno específico seleccionado de una pluralidad de antígenos, y por lo menos un anticuerpo IgM en relación a otro antígeno específico seleccionado de una pluralidad de antígenos.

**[0021]** El patrón de reactividad de la muestra refleja, por lo tanto, los niveles de cada uno de los anticuerpos probados en la muestra, suministrando, por lo tanto, un ensayo cuantitativo. En una sección en particular, la reactividad es determinada cuantitativamente. Por lo tanto, por ejemplo, la reactividad de un anticuerpo en relación a un antígeno puede incrementarse o reducirse. En ciertas secciones, la reactividad de por lo menos un anticuerpo en relación a un antígeno específico (proveniente de una pluralidad de antígenos) es regulada / incrementada. Preferiblemente, la reactividad de los anticuerpos IgG es regulada/incrementada (es decir, se incrementa). En secciones adicionales, la reactividad de por lo menos un anticuerpo en relación a un antígeno específico es regulada/reducida. Preferiblemente, la reactividad de los anticuerpos IgM es regulada/reducida (es decir, se rebaja).

**[0022]** Comúnmente, el determinar la reactividad de anticuerpos en la muestra en relación a una pluralidad de antígenos se realiza utilizando un inmuno - ensayo. Ventajosamente, la pluralidad de antígenos puede ser usada en la forma de un ensayo de antígenos.

**[0023]** De acuerdo a una sección, el método comprende el determinar la reactividad de los anticuerpos IgG en la muestra obtenida proveniente del sujeto en relación a una pluralidad de antígenos seleccionados provenientes de un grupo que consiste de: ácido hialurónico, EBV, ssDNA, dsDNA, BMP4, F50, HGF y HSP60p18. De acuerdo a una sección de ejemplo, el método comprende el determinar la reactividad de los anticuerpos IgG en la muestra obtenida de un sujeto en relación a una pluralidad de antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: ácido hialurónico, EBV, ssDNA y dsDNA. En una sección específica, la reactividad de un anticuerpo IgG en relación a un antígeno (seleccionado de una pluralidad de antígenos) es regulada/incrementada. De acuerdo a esta sección, una regulación/incremento entre el patrón de reactividad de dicha muestra obtenida proveniente del sujeto en comparación con el patrón de reactividad de una muestra de control es una indicación de que el sujeto padece de SLE.

**[0024]** El método comprende el determinar la reactividad de los anticuerpos IgM en la muestra obtenida de un sujeto en relación a una pluralidad de antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: CD99, IGFBP1, MPO, cardiolipina, colágeno III, colágeno IV, actina, CMV, RV, S100A4, CITED1 y FHIT. De acuerdo a una sección de ejemplo, el método comprende el determinar la reactividad de los anticuerpos IgM en la muestra sérica obtenida del sujeto en relación a una pluralidad de antígenos seleccionados provenientes de un grupo que consiste de: CD99, MPO, IGFBP1, cardiolipina y colágeno III. De acuerdo a otra sección, el método comprende el determinar la reactividad de los anticuerpos IgM en la muestra sérica obtenida de un sujeto en relación a una pluralidad de antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: CD99, MPO, IGFBP1, cardiolipina y colágeno III. De acuerdo a otra sección, el método comprende el determinar la reactividad de los anticuerpos IgM en la muestra sérica obtenida del sujeto en relación a una pluralidad de antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: CD99, MPO y Colágeno III. En una sección específica, la reactividad de un anticuerpo IgM en relación a un antígeno (de una pluralidad de antígenos) es regulada/reducida. En una sección específica, la regulación/reducción entre el patrón de reactividad de dicha muestra obtenida de un sujeto en comparación con el patrón de reactividad de control es una indicación que el sujeto padece de SLE.

**[0025]** De acuerdo a otra sección, el método comprende el determinar la reactividad de los anticuerpos IgM en la muestra sérica obtenida de un sujeto en relación a una pluralidad de antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: CD99, MPO y Colágeno III. En una sección en particular, la regulación/reducción entre el patrón de reactividad de dicha muestra obtenida de un sujeto en comparación con el patrón de reactividad de control es una indicación de que el sujeto

padece de en una remisión renal.

5 **[0026]** De acuerdo a otra sección, la muestra obtenida del sujeto es un fluido biológico. De acuerdo a algunas secciones, la muestra es seleccionada de un grupo que consiste de plasma, suero, sangre, fluido cerebrospinal, fluido sinovial, esputo, orina, saliva, lágrimas, especímenes linfáticos, o cualquier otro fluido biológico conocido en la industria. De acuerdo a ciertas secciones, la muestra obtenida del sujeto es seleccionada de un grupo que consiste de plasma, suero y sangre. De acuerdo a una sección, la muestra es una muestra sérica. Cada posibilidad representa una sección separada del invento.

10 **[0027]** De acuerdo a ciertas secciones de los métodos de este invento, el control es seleccionado de un grupo que consiste de una muestra de por lo menos un individuo saludable, un panel de muestras de control de un conjunto de individuos saludables, y un conjunto almacenado de información de individuos saludables. Típicamente, un individuo saludable es un sujeto que no padece de SLE o cualquier otra forma de lupus. En otra sección, un individuo saludable es un sujeto que no padece de ninguna enfermedad autoinmune.

15 **[0028]** De acuerdo a algunas secciones, el método comprende además la dilución de la muestra, por ejemplo, 1:10 o más antes de determinar la reactividad de los anticuerpos en la muestra.

20 **[0029]** Una "diferencia" entre los patrones de reactividad se refiere, en diferentes secciones, a una diferencia estadísticamente diferente significativa, o en otras secciones a una diferencia reconocida por una persona con conocimiento en la industria.

25 **[0030]** Ventajosamente, los métodos del invento podrían utilizar el uso del aprendizaje y reconocimiento de patrones de los analizadores, algoritmos de aglutinamiento y similares, para discriminar entre patrones de reactividad de sujetos saludables de control a aquellos de pacientes que tienen SLE. Como tales, este término incluye específicamente una diferencia medida, por ejemplo, determinar la reactividad de los anticuerpos en una muestra de prueba en relación a una pluralidad de antígenos, y su comparación del patrón resultante de reactividad con los patrones de reactividad de muestras de control negativas y positivas (por ejemplo, las muestras obtenidas de sujetos de control que no padecen de SLE o pacientes que padecen de SLE, respectivamente) utilizando aquellos algoritmos y/o analizadores. La diferencia también podría ser medida al comparar el patrón de reactividad de la muestra de prueba con una regla predeterminada de clasificación obtenida de esa forma.

30 **[0031]** De acuerdo a otro aspecto, los antígenos son seleccionados de un grupo que consiste de: IGFBP1, CD99, ácido hialurónico, MPO, colágeno III.

35 **[0032]** De acuerdo a una sección, los antígenos comprenden además por lo menos uno, por lo menos 2 o por lo menos 3 antígenos seleccionados de dsDNA, ssDNA, EBV y cardiolipina. Cada posibilidad representa una sección separada del invento.

40 **[0033]** Otros objetos, características y ventajas de este invento se volverán claras a partir de la siguiente descripción y esquemas.

#### **DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS ESQUEMAS**

45 **[0034]**

50 La figura 1 muestra la reactividad de anticuerpos de sujetos individuales en relación a las reactividades de antígenos que caracterizan a pacientes con SLE. El suero de controles saludables (cuadrados negros) y de sujetos con SLE en remisión renal (círculos abiertos), nefritis lúpica aguda (triángulos abiertos), o sin una interacción renal (\*) fueron probadas para detectar las reactividades de los anticuerpos en relación al antígeno designado. El monto relativo de reactividad de anticuerpos se muestra en el eje Y. El eje X ordena a los sujetos de acuerdo a su reactividad relativa.

55 La figura 2 muestra un análisis tridimensional de los componentes principales (PCA - principal component analysis). El PCA se basó en 7 reactividades de antígenos que distinguen a controles saludables de pacientes con SLE en remisión renal (tabla 6). La estrella representa la firma de un sujeto que fue saludable en el momento de la recaudación de sueros pero que después desarrolló a SLE, controles saludables son representados por cuadrados negros, sujetos con SLE en remisión renal se muestran como círculos abiertos, sujetos con nefritis lúpica aguda se muestran como triángulos y sujetos con SLE sin una interacción renal se representan como asteriscos.

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO**

60 **[0035]** Este invento suministra métodos para diagnosticar al lupus eritematoso sistémico (SLE - systemic lupus erythematosus) en un sujeto utilizando ensayos de sondas de antígenos para practicar aquel diagnóstico, e identificar conjuntos específicos de sondas de antígenos para generar aquellos ensayos. Por lo tanto, se presenta una prueba de biomarcadores que se basa en autoanticuerpos para una diagnosis temprana de SLE, que incluye a SLE en remisión renal.

**[0036]** Sin desear ser limitado por cualquier teoría en particular o mecanismo de acción, el invento se basa en parte en el hallazgo que el perfil de reactividad de anticuerpos en el suero de pacientes con SLE fue claramente distinto a los individuos saludables de control. Aunque los autoanticuerpos séricos han sido investigados extensamente en lo que se refiere a SLE, las únicas firmas inmunológicas de anticuerpos tal como se describen aquí no han sido descritas antes. Ventajosamente, las únicas firmas de anticuerpos de este invento suministran ensayos altamente sensibles y específicos para diagnosticar a SLE.

**[0037]** De acuerdo a algunas secciones, este invento suministra un método para diagnosticar al lupus eritematoso sistémico (SLE - systemic lupus erythematosus) en un sujeto, y el método comprende:

(i) Determinar la reactividad de los anticuerpos IgG e IgM en la muestra obtenida del sujeto a por lo menos 4 antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: IGFBP1, CD99, ácido hialurónico, EBV, ssDNA, dsDNA, MPO, cardiolipina, colágeno III, colágeno IV, actina, BMP4, CMV, F50, HGF, HSP60p18, RV, S100A4, CITED 1 y FHIT, determinando, por lo tanto, el patrón de reactividad de la muestra en relación a la pluralidad de antígenos, y

(ii) Comparar el patrón de reactividad de dicha muestra en relación a un patrón de reactividad de control,

Donde un incremento en reactividad de los anticuerpos IgG en relación a una pluralidad de antígenos seleccionados del grupo que consiste de: ácido hialurónico, EBV, ssDNA, dsDNA, BMP4, F50, HGF y HSP60p18, y/o una reactividad reducida de los anticuerpos IgM en relación a una pluralidad de antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: IGFBP1, CD99, MPO, cardiolipina, colágeno III, colágeno IV, actina, CMV, S100A4, CITED1 y FHIT en comparación al patrón de reactividad de la muestra de control es una indicación que el sujeto padece de SLE.

**[0038]** el patrón de reactividad de la muestra refleja los niveles de cada uno de los anticuerpos probados en la muestra, suministrando, por lo tanto, un ensayo cuantitativo. En una sección importante, los anticuerpos son determinados cuantitativamente. En otra sección importante, una diferencia cuantitativa entre el patrón de reactividad de dicha muestra obtenida del sujeto en comparación con el patrón de reactividad de control es una indicación que el sujeto padece de SLE. La regulación/incremento de la reactividad de un anticuerpo, específicamente de un anticuerpo IgG, en una muestra en relación a un antígeno se refiere a un incremento (es decir, elevación) de alrededor de por lo menos 2, alrededor por lo menos 3, alrededor por lo menos 4 o alrededor por lo menos 5 veces más (es decir, mayor) que los niveles de reactividad de los anticuerpos en relación al antígeno en el control. La regulación/reducción de la reactividad de un anticuerpo, específicamente de un anticuerpo IgM, en una muestra en relación a un antígeno se refiere a una reducción (es decir, decremento) de alrededor de por lo menos 2, alrededor de por lo menos 3, alrededor de por lo menos 4, o alrededor por lo menos 5 veces más baja que los niveles de reactividad del anticuerpo en relación al antígeno en el control.

**[0039]** Tal como se ejemplifica en este documento más adelante, un análisis de antígenos de autoanticuerpos (es decir, usando análisis de micro ensayos) puede identificar los patrones de autoanticuerpos séricos asociados con las diferentes formas clínicas de SLE; las firmas se basaron en patrones colectivos de autoanticuerpos, y no en reactividades individuales de autoanticuerpos. Estos patrones informativos incluyeron a los autoanticuerpos IgG, así como a los autoanticuerpos IgM. Además, los patrones informativos incluyeron reducciones, así como incrementos de las reactividades de autoanticuerpos en relación a aquellas encontradas en los controles saludables.

**[0040]** En una sección específica, el método comprende:

(i) Determinar la reactividad de los anticuerpos IgG en una muestra obtenida de un sujeto en relación a una pluralidad de antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: ácido hialurónico, EBV, ssDNA y dsDNA;

(ii) Determinar la reactividad de los anticuerpos IgM en una muestra obtenida del sujeto en relación a una pluralidad de antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: CD99, MPO, IGFBP1, cardiolipina y colágeno III; determinando, por lo tanto, el patrón de reactividad de la muestra en relación a una pluralidad de antígenos; y

(iii) Comparar el patrón de reactividad de dicha muestra en relación a un patrón de reactividad de control, donde un incremento entre el patrón de reactividad de los anticuerpos IgG en dicha muestra obtenida del sujeto en comparación con el patrón de reactividad de control es una indicación que el sujeto padece de SLE, o donde exista una reducción entre el patrón de reactividad de los anticuerpos IgM en dicha muestra obtenida del sujeto en comparación con el patrón de reactividad de control es una indicación que el sujeto padece de SLE.

**[0041]** En otra sección adicional, un incremento entre el patrón de reactividad de los anticuerpos IgG en dicha muestra obtenida del sujeto en comparación con el patrón de reactividad de control es una indicación que el sujeto padece de SLE, y una reducción entre el patrón de reactividad de los anticuerpos IgM en dicha muestra obtenida del sujeto en comparación con el patrón de reactividad de control es una indicación de que el sujeto padece de SLE.

**Sondas de antígenos y conjuntos de sondas de antígenos**

**[0042]** Esta especificación también presenta sondas de antígenos y conjuntos de sondas de antígenos útiles para diagnosticar a SLE, tal como se describe en este documento.

5 **[0043]** De acuerdo a los principios del invento, el invento suministra además una pluralidad de antígenos también conocidos en este documento como conjuntos de sondas de antígenos. Estos conjuntos de sondas de antígenos comprenden una pluralidad de antígenos que son reactivos específicamente con el suero de los sujetos que tienen SLE. De acuerdo a los principios del invento, la pluralidad de antígenos puede ser usada ventajosamente en la forma de un ensayo de antígenos. De acuerdo a algunas secciones el ensayo de antígenos es configurado convenientemente en la forma de un chip de antígenos.

10 **[0044]** Una "sonda" tal como se utiliza en este documento significa un compuesto capaz de enlazar específicamente a un componente. De acuerdo a un aspecto, este invento suministra un conjunto de sondas de antígenos conformado de una pluralidad de antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: CD99, IGFBP1, ácido hialurónico, EBV, ssDNA, dsDNA, MPO, cardiolipina, colágeno III, colágeno IV, actina, BMP4, CMV, F50, HGF, HRP, HSP60p18, RV, S100A4, CITED1 y FHIT. De acuerdo a ciertas secciones, el conjunto de sondas de antígenos comprende un subconjunto de los antígenos de este invento. En una sección específica, el subconjunto de antígenos consiste de CD99, IGFBP1, ácido hialurónico, EBV, ssDNA, dsDNA, MPO, cardiolipina y colágeno III. La reactividad de los anticuerpos en relación a la pluralidad de antígenos del invento podría determinarse de acuerdo a técnicas conocidas en la industria. Además, los antígenos utilizados en este invento son conocidos en la industria y están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Sigma Aldrich o Prospec.

#### Ácido hialurónico

25 **[0045]** El ácido hialurónico es un glicosaminoglucano aniónico no sulfatado distribuido ampliamente a través de los tejidos conectores, epiteliales y neurales. En una sección específica, el antígeno de ácido hialurónico de este invento es un ácido hialurónico humano, por ejemplo, proveniente del cordón umbilical de la placenta humana (disponible comercialmente, por ejemplo, de Sigma Aldrich, número de catálogo H1876; número de CAS 9067-32-7). Ejemplos adicionales no limitantes de ácidos hialurónicos sostienen un número de CAS seleccionado de: 31799-91-4 o 9067-32-7.

#### EBV

35 **[0046]** El virus Epstein-Barr (EBV - Epstein-Barr virus), también llamado virus de herpes humana 4 (HHV-4 - Human herpes virus 4), es un virus de la familia del herpes. La reactividad de anticuerpos en relación al antígeno EBV puede terminarse de acuerdo a técnicas conocidas en la industria. En una sección específica, el antígeno de EBV de este invento contiene el antígeno temprano de tipo D de HHV-4 (banco genético: CAD53407.1), en regiones del terminal C en los aminoácidos 306-3 190 tal como se establece en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2. En una sección, dicho EBV consiste de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2, o un análogo o uno de sus fragmentos. El antígeno de EBV está disponible comercialmente, por ejemplo, de Prospec, número de catálogo CMV-272.

#### Ácido desoxirribonucleico de doble hebra (dsDNA)

45 **[0047]** Los anticuerpos anti-dsDNA que son altamente específicos para SLE; están presentes en un 70% de los casos, y aparecen en solamente el 0.5 por ciento de los péptidos sin la presencia de SLE. La reactividad de los anticuerpos en relación al antígeno dsDNA puede determinarse de acuerdo a las técnicas conocidas en la industria. En una sección en particular, el dsDNA tiene un número de CAS de 73049-39-5. El antígeno de 73049-39-5 está disponible comercialmente, por ejemplo, de Sigma Aldrich, número de catálogo D1501.

#### Ácido desoxirribonucleico de una hebra (ssDNA)

50 **[0048]** La reactividad de los anticuerpos en relación al antígeno ssDNA puede determinarse de acuerdo a técnicas conocidas en la industria. En una sección en específico, el ssDNA tiene un número de CAS de 91080-16-9. El antígeno de ssDNA está disponible comercialmente, por ejemplo, de Sigma Aldrich, número de catálogo D8899.

#### CD99

60 **[0049]** CD99 (también conocido como el antígeno E2, glicoproteína de la superficie de la célula T) es expresada en la membrana celular de algunas células de linfocitos, timocitos corticales y de granulosa del ovario. El antígeno también es expresado por la mayoría de células de islotes pancreáticos, células Sertoli de los testículos, y algunas células endoteliales. En una sección específica, el antígeno CD99 de este invento es un CD99 humano (NP\_002405 o NP\_001116370.1). La secuencia de aminoácidos de una isoforma de CD99 humano. Un precursor se establece en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1. En una sección, dicho antígeno CD99 consiste de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1, o un análogo o uno de sus fragmentos. Dicho antígeno CD99 está disponible comercialmente, por ejemplo, de Prospec, número de catálogo PRO-294.

Mieloperoxidasa (MPO)

**[0050]** MPO es una enzima importante utilizada por granulocitos durante la lisis fagocítica de partículas foráneas sumergidas. En tejidos normales y en una variedad de trastornos mieloproliferativos las células mieloides tanto de los tipos neutrofílicos como eosinofílicos, en todas las etapas de maduración, mostraron una fuerte reactividad citoplásmica en relación a MPO. En una sección específica, el antígeno MPO de este invento es un MPO humano (NP\_000241.1). La secuencia de aminoácidos del MPO humano se establece en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 3. En una sección, dicho antígeno MPO consiste de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 3, o un análogo o uno de sus fragmentos. Dicho antígeno MPO está disponible comercialmente, por ejemplo, de Propec, número de catálogo ENZ-334.

Proteína enlazadora del factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGFBP1 - Insulin-like growth factor binding protein 1)

**[0051]** El IGFBP1 es un miembro de la familia de proteínas enlazadoras de factores de crecimiento similares a la insulina (IGFBP) y codifica una proteína con un dominio IGFBP y un dominio de tiroglobulina de tipo I. La proteína se enlaza con los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) I y II y circula en el plasma. El IGFBP1 humano puede producirse recombinantemente como una sola cadena de polipéptidos que contiene a 218 aminoácidos, que tiene una masa molecular de 28.8 KDa. En una sección específica, el antígeno IGFBP1 de este invento es un IGFBP1 humano (NP\_000587.1). La secuencia de aminoácidos del IGFBP1 humano se establece en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 4. En una sección, aquel antígeno IGFBP1 consiste de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 4, o un análogo o uno de sus fragmentos. Dicho antígeno IGFBP1 está disponible comercialmente, por ejemplo, de Prospec, número de catálogo CYT-299.

Cardiolipina

**[0052]** La cardiolipina (1,3-bis(sn-3'-fosfatidil)-sn-glicerol) es un fosfolípido mitocondrial que se encuentra en los tejidos de mamíferos en concentraciones bajas, más a menudo en la membrana mitocondrial interna. La calle Pirulina inhibe la adherencia de células de fibronectina, vitronectina y colágeno de tipo I. En una sección específica, el antígeno cardiolipina de este invento es una cardiolipina bovina. La reactividad de los anticuerpos en relación al antígeno de cardiolipina puede determinarse de acuerdo a técnicas conocidas en la industria. En una sección específica, la cardiolipina tiene un número de CAS de 383907-10-6. El antígeno de cardiolipina bovina está disponible comercialmente, por ejemplo, de 383907-10-6. Número de catálogo C0563.

Colágeno tipo III

**[0053]** El colágeno de tipo III es el 2º colágeno más abundante en los tejidos humanos y ocurre particularmente en los tejidos que muestran propiedades elásticas, tales como la piel, los vasos sanguíneos y varios órganos internos. Las mutaciones del colágeno de tipo III causan la forma más severa del síndrome de Ehlers-Danlos, EDS (Ehlers-Danlos syndrome) IV, que afecta a las arterias, a los órganos internos, a las articulaciones y a la piel, y puede causar una muerte abrupta cuando las arterias grandes se rompen. En secciones específicas, el antígeno de colágeno de tipo III de este invento es un colágeno de tipo III de Bornstein y Traub, por ejemplo, proveniente de la placenta humana. La reactividad de los anticuerpos en relación al antígeno de colágeno III podría determinarse de acuerdo a técnicas conocidas en la industria. En una sección en específico, el colágeno III tiene un número de CAS de 9007-34-5. El antígeno de colágeno III está disponible comercialmente, por ejemplo, de Sigma Aldrich, número de catálogo C4407.

Colágeno tipo IV

**[0054]** En contraste con la mayoría de colágenos, el colágeno de tipo IV es un miembro exclusivo de las membranas basales y por medio de interacciones complejas intra - moleculares e internas forman redes supra moleculares que afectan a la adhesión, migración y diferenciación celular (Khoshnoodi et al., Microsc Res Tech. 2008 May;71(5):357-70). En una sección en específico, el antígeno de colágeno de tipo IV de este invento es un colágeno de tipo IV de Bornstein y Traub, por ejemplo, proveniente de la placenta humana. La reactividad de los anticuerpos en relación al antígeno de colágeno IV podría determinarse de acuerdo a técnicas conocidas en la industria. En una sección específica el colágeno IV tiene un número de CAS de 9007-34-5. El antígeno de colágeno IV está disponible comercialmente, por ejemplo, de Sigma Aldrich, número de catálogo C7521.

Actina

**[0055]** La actina es una proteína de 43 kDa que se conserva altamente entre las especies. Existen 3 isotipos principales de actina ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), que muestran más de un 90% de la homología de aminoácidos (aa) entre isotipos y más del 98% de homología con miembros de un grupo específico isotípico. La actina participa en muchos procedimientos celulares importantes incluyendo la contracción muscular, la morbilidad celular, la división celular y citocinesis, movimiento de la vesícula y movimiento de orgánulos, señalización celular y el establecimiento y

mantenimiento de uniones celulares y de formas celulares. En una sección específica, la antígeno actina de este invento es una actina bovina. La reactividad de los anticuerpos de la antígeno actina puede determinarse de acuerdo a las técnicas conocidas en la industria. En una sección en específico, la actina tiene un número de CAS de 51005-14-2. El antígeno de actina bovina está disponible comercialmente, por ejemplo, de Sigma Aldrich, número de catálogo A3653.

Proteína morfogenética ósea-4 (BMP4 - Bone morphogenetic protein-4)

**[0056]** El BMP4 juega un rol importante en la ocurrencia de la formación ósea endocondral en humanos. Una reducción en la expresión de BMP4 se ha asociado con una variedad de enfermedades óseas, incluyendo el trastorno heredable de Fibrodisplasia osificante progresiva. El BMP humano (por ejemplo, NP\_570912.2) puede producirse recombinantemente en E. Coli en forma de una cadena no glicosilada monomérica de polipéptidos (masa molecular de 13,009 Daltons). En una sección en específico, el antígeno BMP4 de este invento es un BMP4 humano (disponible comercialmente, por ejemplo, de Prospec, número de catálogo CYT-361). En una sección específica, el antígeno BMP4 tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 5 (SPKHHSQRARKKNKNCRRHSLYVDFSDVGWNDWIVAPPGYQAFYCHGDCPFPLADHLNSTNHAI VQTLVNSVNSSIPKACCVPTELSAISMLYLDEYDKVVLKNYQEMV VEGCGCR, o un análogo o uno de sus fragmentos.

CMV

**[0057]** El CMV (citomegalovirus) pertenece a la subfamilia Betaherpesvirinae de las Herpesviridae que incluye a los tipos de virus simples 1 y 2, al virus varicela-zoster, y al virus Epstein-Barr. El CMV es un virus de ADN linear de 2 hebras con 162 capsómeros proteínicos hexagonales rodeados por una membrana lipida. CMV tiene el genoma más grande de los virus del herpes, que varía desde 230-240 parejas de kilobases. El CMV humano se compone de repeticiones únicas e invertidas que incluyen la existencia de 4 isómeros de genoma causados por la inversión de componentes de genoma L-S (clase E). El antígeno CMV utilizado en los ejemplos de este documento, más adelante, es una proteína recombinante derivada de E. Coli que contiene a regiones inmuno - dominantes de CMV Pp150 (UL32) que residen en los aminoácidos 1011-1048. Dicho CMV Pp150 (e.g., GI:224496137 o GI:224496135) es conocido para aquellas personas con conocimiento en la industria. La secuencia de aminoácidos de dicho CMV Pp150 se establece en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 6. En una sección, dicho CMV Pp150 consiste de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 6, o un análogo o uno de sus fragmentos. El antígeno de CMV de este invento es disponible comercialmente, por ejemplo, de Prospec, número de catálogo CMV-216.

F50

**[0058]** El antígeno F50 usado en los ejemplos de este documento a continuación es un oligopéptido que tiene la secuencia de aminoácidos CVKGGTTKIFLVGDYSSSAE tal como se establece en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 7. En una sección, dicho antígeno F50 consiste de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 7 o un análogo o uno de sus fragmentos.

Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF - Hepatocyte Growth Factor)

**[0059]** HGF es un factor de crecimiento multifuncional que regula al crecimiento celular y a la motilidad celular. Ejerce un efecto mitogénico fuerte en los hepatocitos y en las células epiteliales primarias. El HGF humano puede producirse recombinantemente en un baculoviridae como una cadena de polipéptidos no glicosilada de heterodímeros que consiste de una cadena  $\alpha$  de 463 aminoácidos y una cadena  $\beta$  de 234 aminoácidos teniendo una masa molecular total de 78.0 KDa. En una sección específica, el antígeno HGF de este invento es un HGF humano (AAA64297.1). La secuencia de aminoácidos de dicho HGF humano se establece en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 8. En una sección, dicho HGF consiste de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 8, o un análogo o uno de sus fragmentos. Dicho antígeno HGF está disponible comercialmente, por ejemplo, de Prospec, número de catálogo CYT-244.

Peróxido de rábano picante (HRP - Horseradish peroxide)

**[0060]** La peroxidasa de rábano picante es un polipéptido de cadena simple que contiene 4 puentes de disulfuro. Es una glicoproteína que contiene un 18% de carbohidratos. La composición de carbohidratos consiste de galactosa, arabinosa, xilosa, fucosa, manosa, manosamina y galactosamina dependiendo de la isoenzima específica. HRP pertenece al grupo de protoporfirinas ferrosas de peroxidases y pueden aislarse de raíces del rábano picante (*Amoracia rusticana*). La reactividad de los anticuerpos en relación al antígeno HRP puede determinarse de acuerdo a técnicas conocidas en la industria. En una sección específica, el HRP tiene un número de CAS de 9003-99-0. El antígeno HRP está disponible comercialmente, por ejemplo, de Sigma Aldrich, número de catálogo P6782.

HSP60p18

**[0061]** El antígeno HSP60p18 utilizado en los ejemplos de este documento, más adelante, es un oligopéptido que

tiene la secuencia de aminoácidos QSIVPALEIANHRKPLVIIA tal como se establece en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 9. En una sección, dicho antígeno HSP60p18 consiste de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 9, o un análogo o uno de sus fragmentos.

5 Virus de la rubéola (RV - Rubella virus)

[0062] El RV es un virus de RNA de hebras positivas envueltas de la familia de las Togaviridae. En una sección específica, el antígeno RV es una proteína recombinante derivada del E. Coli que contiene los aminoácidos 1-123 de las regiones C de cápsulas de RV. La secuencia de aminoácidos de la cápsula C de RV es conocida para aquellas personas con conocimiento en la industria, por ejemplo, NP\_740662.1. La secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 1-123 de la cápsula C de RV se establece en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 10. En una sección, dicho antígeno RV consiste de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 10, o un análogo o uno de sus fragmentos. Dicho antígeno RV está disponible comercialmente, por ejemplo, de Prospec, número de catálogo RUB-293.

15 S100A4

[0063] La S100A4 (también conocido como la proteína enlazadora de calcio S-100 A4, Metástasina, Calvasculina) es un miembro de la familia S100 de proteínas que contiene a los motivos enlazadores de calcio de mano EF. La S100A está compuesta de una cadena alfa y beta. La S100A4 podría funcionar en polimerización de motilidad, invasión y tubulina. En una sección específica, el antígeno S100A4 del invento es una S100A4 humana (CAG29341.1). La secuencia de aminoácidos de la S100A4 humana se establece en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 11. En una sección, dicho antígeno S100A4 consiste de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 11, o un análogo o uno de sus fragmentos. Dicho antígeno S100A4 está disponible comercialmente, por ejemplo, de Prospec, número de catálogo PRO-307.

25 CITED 1

[0064] El transactivador de interacción Cbp/p300 humano 1 (CITED1, también conocido como la proteína específica de melanocitos 1 o MSG1) es una proteína que tiene 193 aminoácidos (NP\_001138359.1). La secuencia de aminoácidos de CITED1 humano se establece en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 12. En una sección, dicho antígeno CITED1 consiste de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 12, o un análogo o uno de sus fragmentos. El antígeno CITED1 está disponible comercialmente, por ejemplo, de Prospec, número de catálogo PRO-295.

35 FHIT

[0065] La FHIT (triada frágil de histidina) es un miembro de la familia genética de triadas de histidina, involucrada en el metabolismo de purinas. La proteína FHIT es una supresora de tumores con una expresión reducida o sin ninguna expresión en muchos tipos de cáncer. En una sección específica, el antígeno FHIT del invento es un FHIT humano (ABM66093.1). La secuencia de aminoácidos del FHIT humano consiste de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 13, o un análogo o uno de sus fragmentos. Dicho antígeno FHIT está disponible comercialmente, por ejemplo, de Prospec, número de catálogo PRO-297.

[0066] La pluralidad de antígenos (o el conjunto de sondas de antígenos) comprende o consiste de uno de sus subconjuntos, por ejemplo, por lo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, u 11 diferentes antígenos donde cada uno es seleccionado de los antígenos presentados en este invento. Aquellos subconjuntos pueden ser seleccionados para dar como resultado una sensibilidad y/o especificidad óptima del ensayo de diagnóstico. En otras secciones, el conjunto de sondas comprende hasta 10, o en otras secciones hasta 15, 20, 30, 40 o 50 diferentes antígenos. Debe tomarse en cuenta, que mientras que aquellos conjuntos de sondas son considerados suficientes para identificar confiablemente a un sujeto con SLE, los conjuntos de sondas de antígenos utilizados en el invento pueden usarse convenientemente, en ciertas secciones, en la forma de ensayos de antígenos que comprenden un número más grande de antígenos, por ejemplo, alrededor de 25 antígenos o más.

[0067] De acuerdo a una sección específica, el conjunto de sondas de antígenos es conformada por una pluralidad de antígenos seleccionados de CD99, IGFBP1, ácido hialurónico, MPO, EBV, ssDNA, dsDNA, y cardiolipina, tal como se detalla en este documento, para el diagnóstico de SLE.

[0068] En otra sección, un conjunto de sondas se conforma de ácido hialurónico, EBV, ssDNA y dsDNA. Tal como se presenta aquí, este subconjunto de antígenos mostró reactividades reguladas/incrementadas con anticuerpos IgG en sueros obtenidos de los sujetos con SLE. En otra sección, una pluralidad de antígenos consistía de CD99, MPO, IGFBP1 y cardiolipina. Tal como se presentó en este documento, este subconjunto de antígenos demostró reactividades reguladas/reducidas con anticuerpos IgM en los sueros obtenidos de sujetos con SLE.

[0069] En otra sección, un conjunto de sondas que consistía de los antígenos: ácido hialurónico, EBV, ssDNA, dsDNA, CD99, MPO y colágeno III es suficiente para discriminar entre sujetos con SLE con remisión renal, e

individuos saludables que no padecen de SLE. En otra sección, la pluralidad de antígenos consiste de ácido hialurónico, EBV, ssDNA y dsDNA. Tal como se describe en este documento, este subconjunto de antígenos demostró reactividades reguladas/incrementadas con anticuerpos IgG en sueros obtenidos de sujetos con SLE, particularmente SLE con remisión renal. En otra sección, la pluralidad de antígenos consistía de CD99, MPO y colágeno III. Tal como se presenta en este documento, este subconjunto de antígenos demostró reactividades reguladas/reducidas de los anticuerpos IgM en el suero obtenido de los sujetos con SLE, incluyendo aquellos con remisión renal.

**[0070]** Las ondas de antígenos que son utilizadas en los ensayos del invento podrían ser purificadas o sintetizadas usando métodos bien conocidos en la industria. Por ejemplo, una proteína o un péptido proteínico utilizando métodos recombinantes o sintéticos conocidos, incluyendo, pero sin limitarse a, métodos de fases sólidas (por ejemplo, química Boc o f-Moc) y de síntesis de fases de soluciones (Stewart y Young, 1963; Meienhofer, 1973; Schroder y Lupke, 1965; Sambrook et al., 2001). Una persona con conocimiento en la industria posee el conocimiento requerido para obtener o sintetizar las ondas de antígenos del invento. Algunas de las sondas de antígenos también son comercialmente disponibles, por ejemplo, de Sigma (St. Louis, MO, USA), Prospec (Ness-Ziona, Israel), Abnova (Taipei City, Taiwan), Matreya LLC (Pleasant Gap, PA, Estados Unidos), Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, Estados Unidos), Calbiochem (San Diego, CA, Estados Unidos), Chemicon (Temecula, CA, Estados Unidos), GeneTex (San Antonio, TX, Estados Unidos), Novus Biologicals (Littleton, CO, Estados Unidos) Assay Designs (Ann Arbor, MI, Estados Unidos), ProSci Inc. (Poway, CA, Estados Unidos), EMD Biosciences (San Diego, CA, Estados Unidos), Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, Estados Unidos), HyTest (Turku, Finlandia), Meridian Life Science (Memphis, TN Estados Unidos) y Biodesign International (Saco, ME, Estados Unidos), tal como se detalla en este documento más adelante.

**[0071]** Debe tomarse en cuenta, que el invento utiliza sondas de antígenos, así como homólogos, fragmentos y sus derivados, siempre y cuando estos homólogos, fragmentos y derivados sean reactivos reticularmente desde el punto de vista inmunológico con estas sondas de antígenos. El término "reactivos reticularmente desde el punto de vista inmunológico" es utilizado en este documento para referirse a 2 o más antígenos que son enlazados específicamente por el mismo anticuerpo. El término "homólogo" tal como se utiliza en este documento se refiere a un péptido que tiene por lo menos un 70%, por lo menos un 75%, por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, o por lo menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos del antígeno. La reactividad reticular puede determinarse por cualquiera de un número de técnicas de inmuno - ensayos, tales como un ensayo de competencia (que mide la capacidad de un antígeno de prueba para inhibir competitivamente el enlace de un anticuerpo a su antígeno conocido).

**[0072]** El término "fragmento" es utilizado en este documento para referirse a una porción de un polipéptido, o un análogo de un polipéptido que permanece reactivo reticularmente desde un punto de vista inmunológico con las ondas antigénicas, por ejemplo, para reconocer inmuno-específicamente al antígeno objetivo. El fragmento puede tener la longitud de alrededor del 40%, alrededor del 50%, alrededor del 60%, alrededor del 70%, alrededor del 80%, alrededor del 85%, alrededor del 90% o alrededor del 95% del antígeno respectivo.

**[0073]** El término péptido se refiere comúnmente a un polipéptido de hasta alrededor de 50 residuos aminoácidos de largo. De acuerdo a secciones específicas, los péptidos antigénicos del invento pueden tener de 10-50 aminoácidos de largo y son comúnmente de alrededor de 10-30 o alrededor de 15-25 aminoácidos de largo.

**[0074]** El término abarca péptidos naturales (ya sean productos degradados, péptidos sintetizados sintéticamente o péptidos recombinantes), peptidomiméticos (comúnmente, péptidos sintetizados sintéticamente), y los peptoides y semipeptoides análogos de péptidos, y pueden tener, por ejemplo, modificaciones que hacen que los péptidos sean más estables cuando están en un cuerpo o más capaces de penetrar a células. Las modificaciones incluyen, pero no se limitan a: modificaciones de la terminal N; modificaciones de la terminal C; modificaciones de los enlaces de los péptidos, incluyendo, pero sin limitarse a, CH<sub>2</sub>-NH, CH<sub>2</sub>-S, CH<sub>2</sub>-S=O, O=C-NH, CH<sub>2</sub>-O, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, S=C-NH, CH=CH, y CF=CH; modificaciones estructurales; y modificaciones residuales.

**[0075]** Los antígenos utilizados en el invento pueden tener un ácido carboxi terminal, tal como una amida de carboxi, tal como un alcohol de terminal reducida o como cualquier sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, como una sal metálica, incluyendo una sal de sodio, potasio, litio o calcio, o como una sal con una base orgánica, o como una sal con un ácido mineral, incluyendo ácido sulfúrico, ácido hidroclicórico o ácido fosfórico, o como un ácido orgánico, por ejemplo, ácido acético o ácido maléico.

**[0076]** Los derivados funcionales consisten de modificaciones químicas a las cadenas laterales de aminoácidos y/o las partículas de carboxilos y/o aminos de dichos péptidos. Aquellas moléculas derivadas incluyen, por ejemplo, aquellas moléculas en las cuales los grupos de aminos libres han sido derivados para formar hidroclicoratos de aminos, grupos sulfonilos de p-tolueno, grupos de carbobenzoxis, grupos de t-butiloxicarbonilos, grupos de cloroacetilos o grupos de formilos. Los grupos de carboxilos libres pueden ser derivados de sales, ésteres de metilos o de estilos u otros tipos de ésteres o hidracidas. Los grupos de hidroxilos libres pueden derivarse para formar derivados O-acilos u O- alquilos. El nitrógeno de imidazol de histidina puede derivarse para formar N-im-benzilhistidina. También incluidos como derivados químicos son aquellos polipéptidos, que contienen uno o más

derivados de aminoácidos modificados o que ocurren naturalmente de los 20 residuos de aminoácidos estándar. Por ejemplo: la 4-hidroxiprolina puede ser sustituida por prolina; la 5-hidroxilisina puede ser sustituida por lisina; 3-metilhistidina puede ser sustituida por histidina; homoserina puede ser sustituida por serina; y ornitina puede ser sustituida por lisina.

**[0077]** Los residuos de aminoácidos aquí descritos están en la forma isométrica de "L", a menos que se indique otra forma. Sin embargo, los residuos en la forma isométrica "D" pueden ser sustituidos por cualquier residuo de aminoácidos de L, siempre y cuando los péptidos retengan sustancialmente la especificidad deseada de anticuerpos.

**[0078]** Análogos adecuados pueden ser sintetizados fácilmente por métodos y aparatos de síntesis de péptidos que actualmente son consideradas normales o métodos recombinantes. Todos esos análogos se basarán esencialmente en los antígenos del invento de acuerdo a su secuencia de aminoácidos, pero tendrán uno o más residuos de aminoácidos eliminados, sustituidos o agregados. Cuando los residuos de aminoácidos son sustituidos, aquellos reemplazos conservadores que son previstos son aquellos que no alteran significativamente la estructura o antigenicidad del polipéptido. Por ejemplo, aminoácidos básicos serán reemplazados con otros aminoácidos básicos, unos ácidos con otros ácidos y neutrales con otros neutrales. Además de los análogos que comprenden sustituciones conservadoras tal como se acaba de mencionar, análogos que comprenden sustituciones no conservadoras de aminoácidos también se contemplan, siempre y cuando estos análogos sean reactivos reticularmente desde el punto de vista inmunológico con un péptido del invento.

**[0079]** Los antígenos lípidos a ser utilizados en los ensayos del invento pueden ser purificados o sintetizados utilizando métodos bien conocidos en la industria (refiérase, por ejemplo, a Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes (Bioquímica de Lípidos, Lipoproteínas y Membranas), 4.sup.th Ed. (2002; Vance D E y Vance, J E, editors; Elsevier, Amsterdam, Boston); Enzymes in Lipid Modification (Enzimas en Modificación de Lípidos) (2000; Bornsheuer, U T, editor; Wiley-VCH, Weinheim, N.Y.); Lipid Synthesis and Manufacture (Síntesis y Fabricación de Lípidos) (1999; Gunstone, F D, editor; Sheffield Academic Press, Sheffield, Inglaterra; CRC Press, Boca Raton, Fla.); Lipid Biochemistry (Bioquímica de Lípidos), 5.sup.th Ed (2002; Gurr, M I, Harwood, J L, and Frayn, K N, editors; Blackwell Science, Oxford, Malden, Mass). En otra sección, los antígenos de lípidos a ser utilizados en el ensayo del invento pueden ser comprados comercialmente tal como se detalla en este documento más adelante.

### **Métodos de diagnóstico**

**[0080]** De acuerdo a algunas secciones, el invento suministra métodos de diagnóstico útiles para la detección de SLE.

**[0081]** De acuerdo a algunas secciones, los métodos del invento son ejecutados al determinar la reactividad de los anticuerpos en una muestra obtenida de un sujeto de prueba en relación a por lo menos 4 antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: ácido hialurónico, CD99, IGFBP1, EBV, ssDNA, dsDNA, MPO, cardioplipina, colágeno III, colágeno IV, actina, BMP4, CMV, F50, HGF, HSP60p18, RV, S100A4, CITED1 y FHIT, determinando, por lo tanto, el patrón de reactividad de la muestra en relación con la pluralidad de antígenos, y comparando el patrón de reactividad de dicha muestra a un patrón de reactividad de control. Una reactividad incrementada de los anticuerpos IgG en relación a una pluralidad de antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: ácido hialurónico, EBV, ssDNA, dsDNA, BMP4, F50, HGF y HSP60p18, y/o una reactividad reducida de los anticuerpos IgM en relación a una pluralidad de antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: IGFBP1, CD99, MPO, cardioplipina, colágeno III, colágeno IV, actina, CMV, RV, S100A4, CITED1 y FHIT en comparación al patrón de reactividad de una muestra de control es una indicación que el sujeto padece de SLE.

**[0082]** Tal como se utiliza aquí, el término "reactividad de anticuerpos en una muestra" en relación a "una pluralidad de antígenos" se refiere a la reactividad inmunológica de cada anticuerpo en la muestra en relación a un antígeno específico seleccionado de una pluralidad de antígenos. La reactividad inmunológica del anticuerpo en relación al antígeno, es decir, su capacidad para enlazarse específicamente con el antígeno, puede ser utilizada para determinar el monto del anticuerpo en la muestra, suministrando, por lo tanto, un ensayo cuantitativo. Los niveles calculados de cada uno de los anticuerpos probados en la muestra son referidos selectivamente como el patrón de reactividad de la muestra de estos antígenos.

**[0083]** Un anticuerpo "dirigido hacia" un antígeno, es utilizado en este documento como un anticuerpo que es capaz de enlazarse específicamente al antígeno. El determinar los niveles de anticuerpos dirigidos a una pluralidad de antígenos involucra el medir el nivel de cada anticuerpo en la muestra, donde cada anticuerpo es dirigido a un antígeno específico seleccionado de: ácido hialurónico, EBV, ssDNA, dsDNA, CD99, MPO, IGFBP1, cardioplipina, colágeno III, colágeno IV, actina, BMP4, CMV, F50, HGF, HSP60p18, RV, S100A4, CITED1 y FHIT. Este paso es realizado comúnmente utilizando un inmuno - ensayo, tal como se detalla en este documento.

**[0084]** En otras secciones, el determinar la reactividad de los anticuerpos en dicha muestra a dicha pluralidad de antígenos, (y los niveles de cada uno de los anticuerpos probados en la muestra) se realiza por medio de un proceso que comprende:

(i) Contactar a la muestra, bajo condiciones tales que un complejo específico de antígenos-anticuerpos pueda formarse, con un conjunto de sondas de antígenos conformada por dicha pluralidad de antígenos, y

5 (ii) Cuantificar el monto del complejo antígenos-anticuerpos formado por cada sonda de antígenos.

**[0085]** El monto del complejo antígenos-anticuerpos es una indicación del nivel de los anticuerpos probados en la muestra (o la reactividad de la muestra con el antígeno).

10 **[0086]** En ciertas secciones, la muestra de prueba y las muestras de control comprenden a anticuerpos IgG e IgM. Específicamente, la muestra de prueba y las muestras de control pueden comprender a anticuerpos IgG e IgM. En otra sección importante, las muestras de prueba y de control comprenden una pluralidad de anticuerpos IgG y una pluralidad de anticuerpos IgM. En otra sección, la reactividad de por lo menos un anticuerpo en relación a un antígeno específico de una pluralidad de antígenos del invento es regulada / incrementada. En otra sección, la reactividad de por lo menos un anticuerpo en relación a un antígeno específico es regulada/reducida.

15 **[0087]** De acuerdo a otro aspecto, este invento suministra un método para evaluar si un sujeto tiene el riesgo de desarrollar a SLE, cuyo método comprende: (i) determinar la reactividad de los anticuerpos IgG e IgM en una muestra obtenida de un sujeto en relación a por lo menos 4 antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: ácido hialurónico, CD99, EBV, ssDNA, dsDNA, MPO, IGFBP1, cardiolipina, colágeno III, colágeno IV, actina, BMP4, CMV, F50, HGF, HSP60p18, RV, S100A4, CITED1 y FHIT, determinando, por lo tanto, el patrón de reactividad de la muestra en relación a una pluralidad de antígenos, y (ii) comparar el patrón de reactividad de dicha muestra con un patrón de reactividad de control, donde una reactividad incrementada de los anticuerpos IgG en relación a una pluralidad de antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: ácido hialurónico, EBV, sDNA, dsDNA, BMP4, F50, HGF y HSP60p18, y/o una reactividad reducida de los anticuerpos IgM en relación a una pluralidad de antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: IGFBP1, CD99, MPO, cardiolipina, colágeno III, colágeno IV, actina, CMV, RV, S100A4, CITED1 y FHIT en comparación al patrón de reactividad de una muestra de control es una indicación de que el sujeto padece de SLE.

20 **[0088]** De acuerdo a una sección de ejemplo los antígenos consisten de ácido hialurónico, CD99, EBV, ssDNA, dsDNA, MPO, IGFBP1, cardiolipina y colágeno III. De acuerdo a otra sección, la pluralidad de antígenos consiste de ácido hialurónico, CD99, MPO, IGFBP1 y colágeno III.

25 **[0089]** En algunas secciones, los métodos de este invento utilizan un sistema de micro - ensayos de antígenos para caracterizar informáticamente patrones informativos de anticuerpos tales como biomarcadores específicos para subtipos de SLE, tal como se detalla en este documento.

30 **[0090]** Los métodos de diagnóstico difieren en su sensibilidad y especificidad. La "sensibilidad" de un ensayo de diagnóstico es el porcentaje de individuos con la enfermedad que dan un positivo a la prueba (porcentaje de "verdaderos positivos"). Los individuos enfermos que no son detectados por el ensayo son "falsos negativos". Los sujetos que no tienen la enfermedad y que tiene un resultado negativo de la prueba en el ensayo tienen el término de "verdaderos negativos". La "especificidad" del ensayo de diagnóstico es de uno menos la tasa de falsos positivos, donde la tasa de "falsos positivos" se define como la proporción de aquellas personas que no tienen la enfermedad pero que resultan positivos.

35 **[0091]** En algunas secciones, la pluralidad de antígenos es seleccionada para exhibir por lo menos el 70%, por lo menos el 80%, por lo menos el 85%, por lo menos el 90%, por lo menos el 95%, o por lo menos el 99% de sensibilidad, combinado con por lo menos el 70%, por lo menos el 80%, por lo menos el 85%, por lo menos el 90%, o por lo menos el 95% de especificidad. En algunas secciones, la sensibilidad y la especificidad son por lo menos el 75%, por lo menos el 80%, por lo menos el 85%, por lo menos el 90% o por lo menos el 95%.

40 **[0092]** En una sección, el método distingue a SLE con una sensibilidad de por lo menos el 70% hasta una especificidad de por lo menos el 85% cuando se compara a los sujetos de control (por ejemplo, un individuo saludable que no padece de SLE). En otra sección, el método distingue a SLE con una sensibilidad de por lo menos el 80% hasta una especificidad de por lo menos el 90% cuando se compara con sujetos de control. En otra sección, el método distingue a SLE con una sensibilidad de por lo menos el 90% hasta una especificidad de por lo menos el 90% cuando se compara con sujetos de control.

45 **Anticuerpos, muestras e inmunoensayos**

50 **[0093]** Los anticuerpos, o inmunoglobulinas, comprenden 2 cadenas pesadas unidas por enlaces de disulfuros y 2 cadenas ligeras, cada cadena ligera es unida a una de las respectivas cadenas pesadas por medio de enlaces de disulfuros y una configuración en forma de "Y". Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido por un número de dominios constantes (CH). Cada cadena ligera tiene un dominio variable (VL) en un extremo y un dominio constante (CL) en el otro extremo, el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada y el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio

constante de la cadena pesada (CH1). Los dominios variables de cada pareja de cadenas ligera y pesada forman al lugar donde se enlazan los antígenos.

**[0094]** El isotipo de la cadena pesada (gama, alfa, Delta, épsilon o mu) determina la clase de la inmunoglobulina (IgG, IgA, IgD, IgE o IgM, respectivamente). La cadena ligera tiene 2 isotipos (kappa,  $\kappa$  o lambda,  $\lambda$ ) en todas las clases de anticuerpos.

**[0095]** Debe entenderse que cuando los términos "anticuerpo" o "anticuerpos" son utilizados, esto tiene la intención de incluir anticuerpos intactos, tales como anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales (mAbs - monoclonal antibodies), así como sus fragmentos proteolíticos tales como los fragmentos Fab o F(ab')<sub>2</sub>. Además, se incluye dentro del enfoque del invento (por ejemplo, como reactivos de inmunoensayos, tal como se detalla en este documento) anticuerpos quiméricos; anticuerpos recombinantes y diseñados, y sus fragmentos.

**[0096]** Fragmentos de anticuerpos funcionales de ejemplo comprenden a regiones variables completas o esencialmente completas de cadenas ligeras y pesadas y que se definen de la siguiente forma:

(i) Fv, definido como un fragmento diseñado genéticamente que consiste de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresada como 2 cadenas;

(ii) Fv de una sola cadena ("scFv" - single-chain Fv), una molécula de una sola cadena diseñada genéticamente incluyendo la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unidas por un enlace adecuados de polipéptidos.

(iii) Fab, un fragmento de una molécula de anticuerpos que contiene una porción enlazadora de antígenos monovalente de una molécula de anticuerpos, obtenida al tratar a todo el anticuerpo con la papaína de enzimas para generar la cadena ligera intacta y el fragmento Fd de la cadena pesada, que consiste de sus dominios variable y de CH1;

(iv) Fab', un fragmento de una molécula de anticuerpos que contiene una porción enlazadora de antígenos monovalente de una molécula de anticuerpos obtenida al tratar a todo el anticuerpo con pepsina enzimática, seguido por una reducción (2 fragmentos Fab' son obtenidos por cada molécula de anticuerpos); y

(v) F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento de una molécula de anticuerpos que contiene una porción enlazadora de antígenos monovalentes de una molécula de anticuerpos, obtenida al tratar a todo el anticuerpo con la pepsina enzimática (es decir, un dímero de los fragmentos Fab' unido por 2 enlaces de disulfuros).

**[0097]** El término "antígenos" tal como se utiliza en este documento es una molécula o una porción de una molécula capaz de ser enlazada por un anticuerpo. El antígeno es capaz, comúnmente, de inducir un animal para producir un anticuerpo capaz de enlazarse a un epítipo de aquel antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítopes. La reacción específica referenciada a lo que se acaba de mencionar tiene el propósito de indicar que el antígeno reaccionará, en una forma altamente selectiva, con su anticuerpo correspondiente y no con la multitud de otros anticuerpos que podrían ser provocados por otros antígenos. Un "péptido antigénico" es un péptido que es capaz de enlazar específicamente a un anticuerpo.

**[0098]** En otra sección, la detección de la capacidad de un anticuerpo para enlazarse específicamente a una sonda de antígenos puede realizarse al cuantificar la formación específica del complejo antígenos-anticuerpos. El término "enlazar específicamente" tal como se utiliza en este documento significa que el enlace de un anticuerpo a una sonda de antígenos no es inhibida competitivamente por la presencia de moléculas no relacionadas.

**[0099]** En ciertas secciones, el método de este invento es realizado al determinar la capacidad de un antígeno del invento para enlazarse específicamente a anticuerpos del isotipo IgG, o, en otras secciones, a anticuerpos del IgM, aislados de un sujeto.

**[0100]** Métodos para obtener muestras biológicas adecuadas que contengan anticuerpos de un sujeto son bien conocidas dentro de la habilidad de aquellas personas que tienen conocimiento en la industria. Comúnmente, muestras adecuadas comprenden a sangre completa y sus productos derivados, tales como plasma y suero. En otras secciones, otras muestras que contienen anticuerpos podrían utilizarse, por ejemplo, muestras de CSF, orina y saliva.

**[0101]** Numerosos métodos bien conocidos de recaudación de fluidos pueden utilizarse para recaudar la muestra biológica del sujeto para realizar los métodos del invento.

**[0102]** De acuerdo a este invento, cualquier inmunoensayo adecuado puede ser utilizado con los péptidos del sujeto. Aquellas técnicas son bien conocidas para personas con un conocimiento normal en la industria y han sido descritas en muchos manuales y textos de inmunología estándar. En ciertas secciones importantes, determinar la capacidad

de los anticuerpos para enlazarse específicamente con las sondas de antígenos se realiza utilizando un método que se basa en ensayos de sondas de antígenos. Preferiblemente, el ensayo es incubado con sueros diluidos adecuados del sujeto (por ejemplo, diluidos a 1:10) para permitir un enlace específico entre los anticuerpos contenidos en el suero y las sondas de antígenos inmovilizadas, enjuagar el suero que no fue enlazado y sacarlo del ensayo, incubar el ensayo enjuagado con un ligando detectable conjugado con marcaciones de anticuerpos del isotipo deseado, enjuagar las marcaciones no adheridas fuera del ensayo, y medir los niveles de la marcación enlazada a cada sonda de antígenos.

**[0103]** De acuerdo a algunos aspectos, los métodos de este invento pueden practicarse utilizando ensayos de antígenos tal como se presenta en WO 02/08755 y U.S. 2005/0260770 de algunos inventores de este invento. WO 02/08755 es dirigida a un sistema y un artículo de fabricación para aglutinar y, por lo tanto, identificar reactivos de antígenos pre - definidos con inmunoglobulinas no determinadas del suero derivadas de los sujetos pacientes que tengan la necesidad de diagnóstico de la enfermedad o monitoreo del tratamiento. Además, se presentan métodos de diagnóstico y sistemas útiles en estos métodos, que utilizan el paso de aglutinar un subconjunto de antígenos de una pluralidad de antígenos, siendo dicho subconjunto de antígenos reactivos con una pluralidad de anticuerpos derivados de una pluralidad de pacientes, y asociando o disociando los anticuerpos de un sujeto con el aglutinamiento resultante. La publicación de aplicación de patente de Estados Unidos número 2005/0260770 otorgada a algunos de los inventores de este invento presenta un sistema de ensayo de antígenos y sus usos de diagnóstico. La aplicación suministra un método para diagnosticar una enfermedad inmunológica, particularmente la diabetes tipo 1, o su predisposición en un sujeto, que comprende el determinar una capacidad de las inmunoglobulinas del sujeto para enlazarse específicamente a cada sonda de antígenos de un conjunto de sondas antígenos. Las enseñanzas de dichas presentaciones se incorporan por completo tal como si se establecieran en este documento.

**[0104]** En otras secciones, otros inmunoensayos pueden ser utilizados, incluyendo, pero sin limitarse a, el ensayo de inmunoabsorción enlazado a enzimas (ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay), citometría de flujo con esferas múltiplex (tal como el sistema hecho por Luminex), resonancia de plasmones superficiales (SPR – Surface plasmon resonance), elipsometría y otros inmunoensayos que utilizan, por ejemplo, lectura láser, detección de luz, detección de protones por medio de un foto-multiplicador, fotografías con un sistema basado en una cámara digital o un sistema de vídeo, cuenta de radiación, detección de fluorescencia, detección electrónica, detección magnética y cualquier otro sistema que permita una medida cuantitativa de enlaces de antígenos-anticuerpos.

**[0105]** Varios métodos han sido desarrollados para preparar ensayos adecuados para los métodos de este invento. Métodos vanguardistas involucran el usar un aparato robótico para aplicar o “detectar” soluciones distintas que contienen sondas de antígenos a ubicaciones con direcciones específicas separadas muy de cerca en la superficie de un soporte plano, típicamente un soporte de video, tal como una lámina de microscopio, que es procesada subsiguientemente por un tratamiento térmico y/o químico para adherir a las sondas de los antígenos a la superficie del soporte. Convenientemente, la superficie de vidrio es activada primero por un tratamiento químico que deja una capa de grupos reactivos tales como los grupos epoxi en la superficie, que se enlaza covalentemente con cualquier molécula que contenga grupos libres de aminos o tioles. Soportes adecuados podrían incluir además a soportes de silicona, nitrocelulosa, papel y similares.

**[0106]** Preferiblemente, cada sonda de antígenos, o cada subconjunto distinto de sondas de antígenos de este invento, que es adherido a una ubicación específica ubicable del ensayo es adherida independientemente a por lo menos 2, más preferiblemente por lo menos 3 ubicaciones específicas separadas que pueden ser ubicadas del ensayo para permitir la generación de información estadísticamente robusta.

**[0107]** Adicionalmente a las sondas de antígenos del invento, el ensayo puede incluir, ventajosamente, sondas de antígenos de control u otros químicos estándar. Tales sondas de antígenos de control podrían incluir sondas de control de normalización. Las señales obtenidas provenientes de las sondas de control de normalización suministran un control para las variaciones en las condiciones de enlace, intensidad demarcación, eficiencia “de lectura” y otros factores que podrían causar que la señal de una interacción de ligandos de enlace de anticuerpos-sondas varíen. Por ejemplo, señales, tales como intensidad de fluorescencia, se leídas de otras sondas de antígenos del ensayo se dividen para la señal (por ejemplo, la intensidad de fluorescencia) provenientes de las sondas de control de estandarización, normalizando, por lo tanto, las medidas. Las sondas de control de normalización pueden estar enlazadas en varias ubicaciones que se puede localizar en el ensayo de sondas de antígenos para controlar la variación espacial en la eficiencia de las ondas de anticuerpos-ligandos. Preferiblemente, las sondas de control de normalización están ubicadas en las esquinas o filos del ensayo para controlar los efectos del borde, así como en la parte central del ensayo.

**[0108]** Los ligandos de anticuerpos marcados pueden ser de cualquiera de varios tipos de ligandos de anticuerpos. Preferiblemente, el ligando de anticuerpos es un anticuerpo que es capaz de enlazarse específicamente a la porción Fc de los anticuerpos del sujeto que se está utilizando. Por ejemplo, en los casos en los que los anticuerpos del sujeto son del isotipo IgM, el ligando de anticuerpos es preferiblemente un anticuerpo capaz de enlazarse específicamente a la región Fc de los anticuerpos IgM del sujeto.

**[0109]** El ligando de los anticuerpos del sujeto puede conjugarse a cualquiera de los varios tipos de marcaciones detectables. Preferiblemente la marcación es un fluoróforo, más preferiblemente Cy3. Alternamente, el fluoróforo podría ser cualquiera de varios fluoróforos, incluyendo a Cy5, Isotiocianato de fluoresceína (FITC - fluorescein isothiocyanate), ficoeritrina (PE - phycoerythrin), rodamina, Texas red, y similares. Anticuerpos conjugados de fluoróforo adecuados específicos para anticuerpos de isotipos específicos son ampliamente disponibles de proveedores comerciales y métodos para su producción están bien establecidos.

**[0110]** Los anticuerpos del sujeto pueden ser aislados para el análisis de su capacidad para enlazar a sondas de antígenos en cualquiera de varias formas, dependiendo de la aplicación y de su propósito. Puesto que los anticuerpos del sujeto pueden estar adecuadamente y convenientemente en la forma de suero o plasma de sangre o una de sus diluciones (por ejemplo, una dilución de 1:10), los anticuerpos pueden ser expuestos a cualquier nivel deseado de purificación antes de ser probados para su capacidad de enlazar específicamente a sondas de antígenos. El método de este invento puede ser practicado usando anticuerpos completos del sujeto, o fragmentos de anticuerpos del sujeto que contienen una región variable del anticuerpo.

#### **Análisis de datos**

**[0111]** En algunas secciones, los métodos del invento pueden implementar el uso de analizadores de aprendizaje y reconocimiento de tendencias, algoritmos de aglutinamiento y similares, para discriminar entre patrones de reactividad de sujetos que tienen un sub-tipo de SLE en comparación de los sujetos de control. Por ejemplo, los métodos podrían incluir el determinar la reactividad de anticuerpos en una muestra de prueba en relación a una pluralidad de antígenos, y comparar los patrones resultantes con los patrones de reactividad de muestras de control negativas y positivas utilizando aquellos algoritmos y/o analizadores.

**[0112]** Por lo tanto, en otra sección, una diferencia significativa entre el patrón de reactividad de una muestra de prueba en comparación a un patrón de reactividad de una muestra de control, donde la diferencia es computada utilizando un algoritmo de reconocimiento de aprendizaje y de patrones, indica que el sujeto padece de SLE. Por ejemplo, el algoritmo podría incluir, sin limitarse, a clasificadores supervisados o no supervisados incluyendo algoritmos estadísticos que podrían incluir, pero no se limitan a, análisis de componentes principales (PCA - principal component analysis), cuadrados mínimos parciales (PLS - partial least squares), regresión lineal múltiple (MLR - multiple linear regression), regresión de componentes principales (PCR - principal component regression), análisis de función discriminatoria (DEA - discriminant function analysis) incluyendo a análisis discriminatorio lineal (LDA - linear discriminant analysis), y análisis de aglutinamiento incluyendo el vecino más cercano, redes neurales artificiales, algoritmos de aglutinamiento acoplados de 2 direcciones, Perceptrones de capas múltiples (MLP - multi-layer perceptrons), red neural de regresión generalizada (GRNN - generalized regression neural network), sistemas de interferencia difusa (FIS - fuzzy inference systems), mapas auto-organizacionales (SOM - self-organizing map), algoritmos genéticos (GAS - genetic algorithms), sistemas neuro-difusos (NFS - neuro-fuzzy systems), teoría de resonancia adaptable (ART - adaptive resonance theory).

**[0113]** En ciertas secciones, uno o más algoritmos o programas informáticos pueden ser utilizados para comparar el monto de cada anticuerpo cuantificado en la muestra de prueba en contra de un corte determinado (o en contra de un número de cortes predeterminados). Alternamente, una o más instrucciones para realizar manualmente los pasos necesarios pueden ser suministrados por un humano.

**[0114]** Los algoritmos para determinar y comparar análisis de patrones incluyen, pero no se limitan a, análisis de componentes principales, el análisis lineal de Fischer, algoritmos de redes neurales, algoritmos genéticos, reconocimiento de patrones lógicos difusos, y similares. Después de que se completen los análisis, la información resultante puede, por ejemplo, mostrarse en una pantalla, transmitirse a un servidor de computadora o almacenarse en un dispositivo de almacenamiento para su carga subsecuente.

**[0115]** Muchos de los algoritmos son algoritmos que se basan en redes neurales. Una red neural tiene una capa de entrada, capas de procesamiento y una capa de salida. La información en una red neural es distribuida a lo largo de las capas de procesamiento. Las capas de procesamiento están compuestas de nodos que estimulan las neuronas por medio de la interconexión de sus nodos. Similarmente al análisis estadístico que revela patrones subyacentes en una recaudación de información, las redes neurales ubican patrones consistentes en una recaudación de información, que se basa en criterios predeterminados.

**[0116]** Algoritmos adecuados de reconocimiento de patrones incluyen, pero no se limitan a, el análisis de componentes principales (PCA - principal component analysis), análisis discriminatorio lineal de Fischer (FLDA - Fisher linear discriminant analysis), modelaje independiente suave de analogía de clases (SIMCA - soft independent modeling of class analogy), vecinos más cercanos de K (KNN - K-nearest neighbors), redes neurales, algoritmos genéticos, lógica difusa y otros algoritmos de reconocimiento de patrones. En algunas secciones, el análisis discriminatorio lineal de Fischer (FLDA - Fisher linear discriminant analysis) y análisis discriminatorios canónicos (CDA - canonical discriminant analysis) así como sus combinaciones son utilizados para comparar la firma de salida y la información disponible de la base de datos.

**[0117]** En otras secciones, el análisis de componentes principales es utilizado. El análisis de componentes

principales (PCA - principal component analysis) involucra una técnica matemática que transforma un número de variables correlacionadas a un número más pequeño de variables no correlacionadas. El número más pequeño de variables no correlacionadas es conocido como los componentes principales. El primer componente principal o vector propio toma en cuenta mucha de la variabilidad de la información tanto como sea posible, y cada componente sucesor toma en cuenta lo más posible la variabilidad remanente. El objetivo principal de PCA es el reducir las dimensiones del conjunto de información e identificar nuevas variables subyacentes.

**[0118]** El análisis del componente principal compara la estructura de 2 o más matrices de covarianza en una forma jerárquica. Por ejemplo, una matriz podía ser idéntica a otra excepto que cada elemento de la matriz es multiplicado por una sola constante. Las matrices son, por lo tanto, proporcionales entre sí. Más particularmente, las matrices comparten vectores propios idénticos (o componentes principales), pero sus factores propios difieren por una constante. Otra relación entre las matrices es que comparten componentes principales en común, pero sus factores propios difieren. La técnica matemática utilizada en el análisis de componentes principales se llama análisis propios. El vector propio asociado con el valor propio más grande tiene la misma dirección que el primer componente principal. El vector propio asociado con el 2º valor propio más grande determina la dirección del 2º componente principal. La suma de los valores propios da como resultado el rastro de la matriz cuadrada y el número máximo de los vectores propios es igual al número de columnas de esta matriz.

**[0119]** En otra sección, el algoritmo es un clasificador. Un tipo de clasificador es creado al “capacitar” al algoritmo con información proveniente de un conjunto de capacitación y cuyo rendimiento es evaluado con la información del conjunto de prueba. Ejemplos de clasificadores utilizados en conjunto con el invento son análisis discriminatorios, análisis de decisiones ramificadas, curvas o divisiones del operador y receptor y análisis de puntajes.

**[0120]** El término “decisión ramificada” se refiere a un clasificador con una estructura de ramificaciones similares a un flujograma utilizado para clasificaciones. Ramificaciones de decisiones consisten de divisiones repetidas de un conjunto de información a subconjuntos. Cada división consiste de una regla sencilla aplicada a una variable, por ejemplo, “si el valor de la variable uno “es mayor que “el límite uno”; entonces vaya a la izquierda, si no vaya a la derecha”. Asimismo, el espacio dado característico es partido en un conjunto de rectángulos asignando cada rectángulo a una clase.

**[0121]** Los términos “conjunto de pruebas” o “desconocidos” o “conjunto de validación” se refieren a un subconjunto de todo el conjunto de información disponible que consiste de aquellas entradas no incluidas en el conjunto de capacitación. La información de prueba es aplicada para evaluar el rendimiento de los clasificadores.

**[0122]** Los términos “conjunto de capacitación” o “conjunto conocido” o “conjunto referencial” se refieren a un subconjunto del conjunto completo respectivo de información disponible. El subconjunto es, típicamente, seleccionado aleatoriamente, y es usado exclusivamente con el propósito de la construcción del clasificador.

### **Diagnóstico de SLE**

**[0123]** Los métodos del invento son útiles en el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico (SLE - systemic lupus erythematosus). En algunas secciones, el SLE es cutáneo. En algunas secciones, dicho SLE es cutáneo subagudo o SCLE (subacute cutaneous SLE). Otras formas de lupus también pueden ser diagnosticadas utilizando los métodos y botiquines del invento, tales como nefritis, cerebritis, extrarrenal, pediátrica, no renal, discoide (DEL) y alopecia. Cada posibilidad es una sección separada del invento. “Lupus” tal como se utiliza en este documento es una enfermedad o trastorno autoinmune que involucra anticuerpos que atacan al tejido conectivo.

**[0124]** Tal como se utiliza aquí, el término “diagnóstico” o “diagnosis” se refiere al proceso de identificar una condición o enfermedad médica (por ejemplo, SLE) mediante sus señales, síntomas y en particular de los resultados de varios procedimientos de diagnóstico, incluyendo, por ejemplo, detectar la reactividad de anticuerpos en una muestra biológica (por ejemplo, suero) obtenida de un individuo, en relación a una pluralidad de antígenos. Además, tal como se utiliza en este documento el término “diagnosis” o “diagnóstico” abarca la detección de una enfermedad, examinando una presencia o una gravedad de una enfermedad, distinguiendo una enfermedad de otras enfermedades incluyendo aquellas enfermedades que pueden presentar uno o más síntomas similares o idénticos, suministrando una prognosis de la enfermedad, monitoreando el progreso o relapso de la enfermedad, así como una evaluación de la eficacia y/o relapso del tratamiento de una enfermedad, trastorno o condición, así como la selección de una terapia y/o un tratamiento para una enfermedad, la optimización de cierta terapia para una enfermedad, el monitoreo del tratamiento de una enfermedad, y/o la predicción de la sostenibilidad de una terapia para pacientes o sub-poblaciones específicas o el determinar la dosis apropiada de un producto terapéutico en pacientes o sub-poblaciones.

**[0125]** Tal como se demuestra en este documento más adelante (ejemplo 4), una muestra fue obtenida de un sujeto cuando ella estaba en un estado saludable y fue negativa para anticuerpos estándar anti-ADN, pero 8 meses después ella empezó a padecer de síntomas no específicos y se encontró, después de 7 meses, que cumplió con los criterios para un diagnóstico de SLE. Por lo tanto, la firma del micro - ensayo de antígenos también podría detectar SLE pre-clínicos. En una sección específica, el método y botiquines del invento son útiles para diagnosticar

a SLEs pre clínicos. En otra sección específica, el método y botiquines del invento son útiles para una detección temprana de SLE.

5 **[0126]** En una sección, el sujeto a quien se está diagnosticando, de acuerdo a los métodos del invento, es sintomático. En otras secciones, el sujeto es asintomático.

**[0127]** El procedimiento de diagnosis puede realizarse in vivo o in vitro, preferiblemente in vitro.

Criterios para diagnosticar a SLE

10 **[0128]** Los criterios de 1982 de The American College of Rheumatology (la Universidad Americana de Reumatología) resumen las características necesarias para diagnosticar a SLE. La presencia de 4 de los 11 criterios producen una sensibilidad de un 85% y una especificidad del 95% para SLE. Pacientes con SLE pueden presentar cualquier combinación de características clínicas y evidencia serológica de lupus.

- 15
- Serositis - pleuresía, pericarditis en exámenes o ECG diagnóstico o toma de imágenes.
  - Úlceras orales - orales o de la nasofaringe, usualmente indoloras; el paladar es más específico.

20

  - Artritis-no erosiva, 2 o más articulaciones periféricas con sensibilidad o hinchazón.
  - Fotosensibilidad-reacción térmica inusual cuando existe exposición a la luz.

25

  - Enfermedades sanguíneas - leucopenia ( $<4 \times 10^3$  células/mL en más de una ocasión), linfopenia ( $<1500$  células/mL en más de una ocasión), trombocitopenia ( $<100 \times 10^3$  cells/mL en la ausencia de medicamentos ilícitos), anemia hemolítica.
  - Interacción renal - proteinuria ( $>0.5$  g/d o 3+ positivo en pruebas de tiras reactivas) o cilindros celulares.

30

  - ANAs - concentraciones superiores generalmente más específicas ( $>1:160$ ); debe ser en la ausencia de medicaciones asociadas con lupus inducido por drogas.

35

  - Fenómeno inmunológico - dsDNA; anticuerpos anti-Smith (Sm); anticuerpos antifosfolípidos (inmunoglobulina anticardiolipina G [IgG - inmunoglobulin G] o inmunoglobulina M [IgM] o anticoagulante de lupus); resultados de pruebas serológicas con un falso-positivo biológico para sífilis, células de lupus eritematoso (LE) (omitido en 1997).
  - Enfermedad neurológica - epilepsia o psicosis en la ausencia de otras causas.

40

  - Irritación malar - eritema fijo sobre los cachetes y el puente nasal, plano o elevado.
  - Irritación discoide - lesiones eritematosas anulares elevadas con escalas queratósicas y conexiones foliculares, a menudo con cicatrices.

45 **[0129]** Dos de los instrumentos más usados comúnmente para el diagnóstico de SLE son el Índice de Actividad de la Enfermedad de Lupus Eritematoso Sistémico (SLEDAI - Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) y la Medida de Actividad de Lupus Sistémico (SLAM - Systemic Lupus Activity Measure).

El Índice de Actividad de la Enfermedad SLE (SLEDAI - SLE Disease Activity Index)

50 **[0130]** El SLEDAI es un índice que mide la actividad de la enfermedad a pesar la importancia de cada sistema orgánico involucrado. El SLEDAI incluye 24 elementos, que representan a 9 sistemas orgánicos. Las variables se obtienen por medio de examinación histórica y física y por evaluaciones de laboratorio. Cada elemento es pesado desde 1 hasta 8 basándose en la significancia del órgano involucrado. Por ejemplo, a las úlceras bucales se les asigna un puntaje de 2, mientras que a los ataques epilépticos se les asigna un puntaje de 8. Los parámetros de laboratorio que se incluyen en el SLEDAI incluyen un conteo de glóbulos blancos, un conteo de plaquetas, análisis de orina, suero C3, C4 y de anti-dsDNA. El puntaje total máximo es 105.

55

Medición de la Actividad de Lupus Sistémico (SLAM - Systemic Lupus Activity Measure)

60 **[0131]** La SLAM incluye a 32 elementos que representan a 11 sistemas orgánicos. A los elementos se les asigna puntaje no solo como presentes / ausentes, sino que se los califica en una escala de 1 a 3 basándose en su gravedad. El total puntaje posible para SLAM es 86. El SLEDAI y SLAM han demostrado ser válidos, confiables y sensibles al cambio a lo largo del tiempo (Liang et al. 1989, Arth Rheum 32:1107-18), y son usados ampliamente en protocolos de investigación y ensayos clínicos. Estos índices son particularmente útiles para examinar el valor de los

65

marcadores serológicos o inflamatorios que se han propuesto recientemente de la actividad de la enfermedad en SLE.

[0132] A pesar de la utilidad obvia de estos instrumentos, existen algunas debilidades. Primeramente, no existe siempre una configuración completa entre SLAM y SLEDAI en el mismo conjunto de pacientes. Existen algunas posibles razones para estas discrepancias. A diferencia de SLEDAI, SLAM incluye síntomas constitucionales tales como fatiga y fiebre, que podrían o no ser consideradas atribuibles a un SLE activo; estos índices de actividad se basan en la interpretación física. Adicionalmente, SLEDAI no captura grados leves de actividad en algunos sistemas orgánicos y no tiene descripciones para varios tipos de actividades, tales como la anemia hemolítica.

[0133] Los siguientes ejemplos son presentados para ilustrar más completamente algunas secciones del invento. Ellas no deberían ser consideradas, sin embargo, como limitantes de la amplia cobertura del invento.

**EJEMPLOS**

**Materiales y métodos**

**Sujetos humanos**

[0134] El estudio aprobado por la junta de revisión institucional de cada unidad clínica participante; un consentimiento informado fue obtenido de todos los pacientes.

[0135] 3 grupos de pacientes de SLE y un grupo de control fueron estudiados: 15 pacientes en remisión renal; 14 pacientes con nefritis de lupus activa; 11 pacientes sin una interacción renal; y 16 controles saludables de iguales proporciones en lo que se refiere a edad y género. Las muestras sanguíneas y los datos clínicos fueron recaudados de los pacientes con SLE que llegaron a la unidad de reumatología y el departamento de hematología del Centro médico Sheba, en Israel; la unidad de reumatología en el centro médico de Hadassah, Ein Kerem, Jerusalem, Israel; y la unidad biológica celular y de inmunogenética de la nación para investigaciones biológicas, Medellín, Colombia. Todos los pacientes cumplieron con los criterios del American College of Rheumatology (Universidad Americana de Reumatología) para SLE (Tan et al: Arthritis.Rheum. 25:1271, 1982; actualizado por MC Hochberg, Arthritis (Artritis). Rheum. 1997; 40:1725.). Los pacientes con SLE con nefritis de lupus activa fueron definidos por un SLEDAI mayor o igual a 8 y uno de lo siguiente: una nueva ocurrencia de proteinuria mayor o igual que un gramo; un incremento en la tasa de proteína urinaria: queratina superior o igual que 2; o un incremento mayor o igual que un 50% de la línea base del suero de creatinina. Los pacientes con SLE en remisión renal fueron individuos que alguna vez fueron diagnosticados con nefritis activa de lupus tal como se definió anteriormente, pero ahora tenían un índice de actividad de la enfermedad de lupus eritematoso sistémico (SLEDAI) menor o igual a 4 y algo de lo siguiente: un regreso al nivel de queratina sérica de la línea base con una reducción de proteinuria dentro del 25% de su nivel de línea base, o un regreso a la línea base de la proteinuria y un regreso de la creatinina sérica adentro del 25% de su nivel de línea base. Todos los pacientes en remisión permanecieron estables por lo menos durante 6 meses; el tiempo medio de remisión fue de 8 años; el rango fue de 3 meses a 30 años. Se constató que los pacientes sin una interacción renal conocida no padecieron una interacción de los riñones en el pasado y durante el seguimiento de por lo menos un año. El tiempo medio desde la diagnosis fue de 7 años; el rango fue de desde 0.5 a 27 años. Información adicional de los pacientes se muestran en la tabla 2 (los valores son presentados como una media ± un error estándar o un porcentaje).

Tabla 2-las características clínicas de los pacientes SLE

Características	Interacción renal		
	Nada (N = 11)	Remisión (N = 15)	Activo (N = 14)
Género (porcentaje femenino)	100%	87%	86%
Edad (años)	40.6 ± 4.4	36.1 ± 3.2	32.4 ± 2.5
SLEDAI	1.8 ± 1	1.1 ± 0.4	14.6 ± 2.2
Anti ADN Ab (porcentaje positivo)	18%	40%	86%
Complemento (porcentaje reducido)	9%	7%	83%
Creatinina miligramos/dL	0.75 ± 0.03	0.97 ± 0.08	1.2 ± 0.26
Duración de la enfermedad (meses)	84 ± 29	150 ± 23	118 ± 25

Micro - ensayos de antígenos y pruebas séricas

[0136] Chips de micro ensayos de antígenos fueron preparados tal como se describió en Merbl et al. 2007 J. Clin. Invest. 117:712- y Quintana et al. 2006, Lupus 15:428-30; y Quintana et al. 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos. 101: 14615-21.

[0137] 694 antígenos, cada uno a su concentración óptima (la mayoría a 1 mg/mililitro), fueron colocados en triplicado en sustratos de vidrio activados con epoxi utilizando un robot de 48 pernos (Microgrid 600, Genomics Solutions, Ann Arbor, MI, Estados Unidos). Estos antígenos incluyeron proteínas, péptidos sintéticos de las secuencias de proteínas seleccionadas, nucleótidos, fosfolípidos y otras moléculas autónomas y no autónomas. Los micro ensayos fueron bloqueados entonces durante una hora a 37 °C con 1% de albúmina sérica bovina. El suero de pruebas en un amortiguador de bloqueo (diluido a 1:10) se incubó bajo un cobertor durante una hora a 37 °C. Los ensayos se lavaron y se incubaron durante una hora a 37 °C con una dilución de 1:500 de 2 anticuerpos de detección, mezclados juntos: un anticuerpo conjugado con Cy3 de IgG anti-humano de cabra, y un anticuerpo conjugado con Cy5 de IgM anti-humano de cabra, (ambos comprados de Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. West Grove, PA, Estados Unidos). La adquisición de imágenes se realizó por medio de láser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos) y los resultados fueron analizados por el software Quantarray (Packard BioChip Technologies, Billerica, MA, Estados Unidos) y por un software desarrollado adicionalmente. El rango cuantitativo de la intensidad de la señal de enlaces a cada lugar de antígenos fue de 0-65,000; este rango de detección hizo posible el obtener información confiable a una dilución de 1:10 de las muestras de prueba (Quintana et al.. Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos. 105:18889-94). Anticuerpos anti-ADN también fueron medidos por separado usando ELISA (QUANTA-Lite, Inova, San Diego, CA) y el ensayo Farr (Wold et al., ciencia 161: 806).

Análisis de imágenes y procesamiento de datos

[0138] Lugares errados técnicamente fueron excluidos manualmente por medio de una inspección visual de cada diapositiva. Las intensidades de primer plano y del plano posterior de varios lugares de cada antígeno fueron promediadas, y un valor de logaritmo de base 10 de la diferencia entre el primer plano y el plano de fondo se calcularon; las diferencias menores a 500 fueron restringidas a 500 y luego transformadas a logaritmos. Para controlar las diferencias entre las diferentes diapositivas, el valor promedio de la intensidad de láser de cada diapositiva (en el correspondiente canal IgM o IgG) fue sustraído. El valor de cada antígeno fue cambiado entonces para que el valor mínimo de todo el conjunto de datos sea igual a cero. El valor resultante fue tomado como la reactividad del antígeno de los anticuerpos que se enlazan a aquel antígeno localizado. Los antígenos que mostraron una reactividad de cero en más del 80% de las diapositivas fueron excluidos, tal como fueron los antígenos cuyos coeficientes de variación a lo largo de las diapositivas fueron más bajos que el 20%. De esta forma, las reactividades de los antígenos IgM 694 y el IgG 694 fueron reducidas a alrededor de 930 reactividades, casi separadas por igual entre los canales IgM e IgG.

Análisis estadístico

[0139] Se realizó un análisis estadístico para identificar las reactividades de antígenos y los grupos de reactividades de antígenos que pueden distinguirse entre los diferentes grupos y sujetos. Las diferentes comparaciones fueron realizadas en la misma forma, designadas genéricamente en este documento como los grupos A y B, cada uno consistiendo de  $n_A$  and  $n_B$  sujetos (siendo cada sujeto una diapositiva de microensayo separada). Para estimar la calidad de la diferenciación entre los grupos A y B, un procedimiento de dejar a uno fuera (LOO - leave-one-out) se aplicó (Duda et al., 2001, Pattern Classification (Clasificación de Patrones). John Wiley and Sons, Inc., New York. 654 pp): se dejó afuera a un sujeto de  $n_A+n_B$ , y el resto de los sujetos de  $n_A+n_B-1$  fueron utilizados para seleccionar los antígenos candidatos para separar a los grupos A y B. Una prueba T entre los grupos A y B (excluyendo a un sujeto) se aplicó, y los antígenos  $d$  que pasaron un nivel de una tasa falsa de descubrimiento (FDR - false discovery rate) del 5% fueron seleccionados (Benjamini et al., 1995, Journal of the Royal Statistical Society (Revista de la Real Sociedad Estadística) B. 57:289-300). Estos antígenos fueron utilizados entonces para clasificar al sujeto que se quedó afuera utilizando el algoritmo de los vecinos más cercanos  $K$  (Duda et al., 2001), con  $K = 3$ . Más específicamente, el sujeto que se dejó afuera busca por sus 3 puntos más cercanos de datos de sujetos en el espacio dimensional  $d$  que contienen los otros sujetos  $n_A+n_B-1$ , y realiza su clasificación de acuerdo a la clase con la mayoría de estos 3 sujetos. Este procedimiento fue repetido para todos los sujetos de  $n_A+n_B$ ; el rendimiento, que aparece en la tabla 3 fue simplemente el número de clasificaciones erróneas, cuantificadas como medidas de especificidad (una tasa de falsos positivos) y sensibilidad (una tasa de falsos negativos).

[0140] La composición de la lista de reactividades separadoras de antígenos puede variar dependiendo del sujeto específico que se deja afuera en la ejecución específica de validación reticular de LOO. Para identificar aún más las reactividades de antígenos que pueden jugar un rol importante en los grupos de separación A y B, las reactividades de antígenos que aparecieron en la lista de candidatos en por lo menos el 90% de las pruebas LOO fueron seleccionados. El procedimiento de LOO fue repetido con cada una de estas reactividades seleccionadas de antígenos, actuando individualmente, a clasificar al sujeto que se quedó afuera utilizando un criterio de límites más simple: los valores de reactividad de los sujetos de capacitación de los sujetos de entrenamiento  $n_A+n_B-1$  para los

5 cuales se encontró aquel valor límite que maxi miso la especificidad, y luego se clasificó el punto de dejar afuera usando este límite. La especificidad y sensibilidad LOO promedio de ésta clasificación en los sujetos de nA+nB-1 aparecen para cada uno de los antígenos seleccionados en las tablas 4 y 6. Para probar el rendimiento de las combinaciones de las reactividades de antígenos, la combinación específica fue proyectada a un espacio unidimensional usando el análisis de componentes principales (PCA - principal component analysis), y la combinación fue tratada de acuerdo al tratamiento dado a las reactividades individuales que se mencionaron anteriormente.

10 [0141] Adicionalmente a la prueba de LOO, los sujetos en los grupos A y B, fueron tomados en cuenta juntos con su lista de reactividades diferenciadoras de antígenos, y usadas para clasificar a un grupo de prueba C por medio de los 3 vecinos más cercanos. Por ejemplo, toda la lista de reactividades frecuentes de antígenos que separó a los controles saludables de los sujetos con SLE en remisión renal fue utilizada para clasificar a los otros 2 grupos con SLE - aquellos en un relapso renal y aquellos sin una interacción renal. La figura 2 muestra una proyección de estas reactividades de antígenos en un espacio tridimensional usando una representación de un análisis de componentes principales (PCA - principal component analysis) (Duda et al., 2001).

15 **EJEMPLO 1**

20 Las reactividades de microensayos de antígenos diferencian a sujetos con SLE de los controles saludables

25 [0142] La tabla 3 muestra un análisis global de las 930 reactividades totales de anticuerpos de los sujetos saludables de control en comparación con aquellos de los 3 grupos con SLE basándose en una prueba de dejar a uno afuera (LOO - leave one out): todos los sujetos con SLE; los sujetos con SLE en remisión renal; y los sujetos con SLE con una nefritis de lupus activa. El promedio de sensibilidad y especificidad de LOO se presentan para un clasificador de vecinos más cercanos de K = 3.

30 [0143] El análisis muestra que las reactividades de los micro ensayos separaron claramente a los 3 grupos de los sujetos con SLE de controles saludables. Una comparación entre los controles saludables y los sujetos con SLE sin una interacción renal no aparece en la tabla porque ningún antígeno excedió el nivel FDR del 5% en algunas de las pruebas de LOO. Además, los varios sub-grupos de los sujetos con SLE, con los números limitados disponibles para pruebas, tampoco pudieron separarse entre sí porque ninguna de las reactividades de los antígenos sobrepasó un nivel de FDR del 5% en ninguna de las pruebas de LOO.

35 Tabla 3-rendimiento del microensayo de antígenos en diferentes tareas de clasificación

35	Controles saludables en comparación a:	Sensibilidad	Especificidad
	Todos los sujetos con SLE	90%	81%
	Sujetos con SLE en remisión renal	93%	100%
40	Pacientes con SLE con nefritis activa de lupus	86%	100%

45 **EJEMPLO 2**

Los sujetos con SLE manifiestan regulaciones / incrementos y reducciones de las reactividades individuales

50 [0144] La tabla 5 lista a las reactividades específicas de anticuerpos distinguidas en todos los pacientes con SLE como un grupo de los sujetos saludables de control. 8 reactividades de anticuerpos fueron reguladas/incrementadas en el grupo con SLE en comparación con el control: dsDNA, ssDNA, ácido hialurónico, EBV, BMP4, F50, HGF y hsp60p18. Además, 13 reactividades de anticuerpos IgM fueron reguladas/reducidas en el grupo con SLE en comparación con el control: MPO, IGFBP1, CD99, Cardiolipina, actina, CMV, colágeno-III, colágeno-IV, RV, S100A4, CITED1 y FHIT.

55 [0145] La tabla 4 lista a las reactividades específicas de anticuerpos que distinguieron a todos los pacientes con SLE como un grupo de los sujetos saludables de control. La figura uno muestra montos relativos de reactividades de anticuerpos en relación a los antígenos listados en la tabla 4 en cada suero. Las diferencias entre los 2 grupos para cada uno de estos antígenos excedió un nivel FDR del 5% (p<0.0007). 4 reactividades de anticuerpos IgG fueron reguladas/incrementadas en el grupo con SLE: las reactividades clásicas a dsDNA y ssDNA, la reactividad al virus Epstein-Barr (EBV - Epstein-Barr Virus), que se demostró previamente que tiene una asociación fuerte con SLE (Barzilai et al., 2007, Ann. N Y Acad. Sci. 1108:567-77), y una reactividad sorpresiva al ácido hialurónico (figura 1).

60 Tabla 4-reactividades de anticuerpos que distinguen individualmente a los sujetos saludables de control de todos los pacientes con SLE

Antígenos	Isotipo de inmunoglobulina	Sensibilidad (porcentaje)	Especificidad (porcentaje)
regulados/incrementados con SLE			
dsDNA	IgG	58	87
ssDNA	IgG	75	94
Ácido hialurónico	IgG	86	86
EBV	IgG	70	88
Regulados/reducidos con SLE			
MPO	IgM	78	88
IGFBP1	IgM	59	82
CD99	IgM	61	93
Cardiolipina	IgM	60	81
Todos los 8 antígenos	IgM + IgG	93	88
todos los 4 antígenos IgG	IgG	90	88
todos los 4 antígenos IgM	IgM	68	88

[0146] Se encontró que 4 reactividades nuevas de antígenos, todas IgM, estaban reguladas/reducidas en SLE: la proteína enlazadora del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGFBP1 - Insulin-like growth factor binding protein 1), CD99, Cardiolipina y mieloperoxidasa (MPO). Las actividades de los anticuerpos IgM de los sujetos con SLE a estos antígenos tendieron a ser bajos o indetectables en comparación con los controles saludables (figura 1). En contraste a las reactividades reducidas de IgM hacia MPO y hacia la cardiolipina, anticuerpos IgG incrementados a estos antígenos han sido asociadas con SLE y otras enfermedades relacionadas con la vasculitis (Barzilai et al., 2007; Sen e Isenberg, 2003 Lupus 12:651-8; Love, P.E. y Santoro, S.A. 1990, Ann. Intern. Med. 112:682-98; Moreland et al., 1991. Clin. Immunol. Immunopathol. 60:412-8).

[0147] La tabla 4 muestra que, a excepción de la reactividad de IgG en relación al ácido hialurónico, las otras reactividades individuales mostraron una sensibilidad para SLE de menos del 80%. Sin embargo, las especificidades de cada reactividad, ya sea por un IgG incrementado o un IgM reducido, fueron superiores al 80%. La combinación de todas las 8 reactividades incrementó la sensibilidad a más del 90% junto con la combinación de 4 reactividades incrementadas de IgG fue más sensible que la combinación de las 4 reactividades reducidas de IgM: 90% en comparación con el 68%, respectivamente. Las especificidades de cada uno de los conjuntos combinados fueron igual al 88%.

Tabla 5-reactividades de anticuerpos que distinguen individualmente a los sujetos saludables de control de todos los pacientes con SLE

Antígenos	Isotipo de inmunoglobulina	Sensibilidad (porcentaje)	Especificidad (porcentaje)
regulados/incrementados con SLE			
dsDNA	IgG	58	87
ssDNA	IgG	75	94
Ácido hialurónico	IgG	86	86
EBV	IgG	70	88
BMP4	IgG	38	88
F50	IgG	38	88
HGF	IgG	69	82
hsp60p18	IgG	49	87
Regulados/reducidos con SLE			
MPO	IgM	78	88
IGFBP1	IgM	59	82
CD99	IgM	61	93
Cardiolipina	IgM	60	81
Actina	IgM	58	77
CMV	IgM	53	87
colágeno III	IgM	64	83
colágeno IV	IgM	57	77
HRP	IgM	44	88
RV	IgM	38	88
S100A4	IgM	36	88
CITED	IgM	45	88
FHIT	IgM	23	88

**EJEMPLO 3**

Los sujetos con SLE en remisión mantienen una firma de SLE

[0148] Una pregunta importante es si la remisión clínica renal está asociada con un retorno de la tendencia de anticuerpos SLE a un estado de salud. La tabla 6 muestra que los pacientes con SLE en remisión clínica todavía mantuvieron una firma de SLE. Estos pacientes manifestaron reactividades significativamente reguladas/incrementadas de IgG a los mismos 4 antígenos que caracterizaron al conjunto general de sujetos con SLE: dsDNA, ssDNA, ácido hialurónico y EBV. Además, aquellos en remisión manifestaron una regulación/reducción de las 3 reactividades IgM, de las cuales 2 eran características generales del grupo con SLE: una reactividad

reducida de IgM en relación a CD99 y en relación a MPO estuvieron presentes en ambos grupos, pero aquellos en remisión manifestaron una reactividad reducida de IgM en relación al colágeno III en vez de en relación a la cardiolipina y en relación al IGFBP1 (figura 1).

5 **[0149]** La tabla 6 también muestra que el combinar a las 4 reactividades incrementadas de IgG y 3 reducidas de IgM conllevó un 100% de sensibilidad y un 94% de especificidad. Por lo tanto, una combinación de reactividades puede suministrar un nivel más alto de precisión que cualquier los componentes de reacción individualmente. Nótese que el conjunto de reactividades combinadas reducidas de IgM se desempeñó tan bien como el conjunto de reactividades combinadas incrementadas de IgM lo cual parece ser una característica de SLE.

10 Tabla 6-reactividades de anticuerpos que distinguen individualmente a sujetos saludables de control de los pacientes con SLE en remisión renal

Antígenos	Isotipo de Ig	Sensibilidad (porcentaje)	Especificidad (porcentaje)
regulados/incrementados con SLE			
dsDNA	IgG	87	94
ssDNA	IgG	47	87
Ácido hialurónico	IgG	93	86
EBV	IgG	73	88
Regulados/reducidos con SLE			
MPO	IgM	87	94
colágeno III	IgM	73	83
CD99	IgM	77	93
Todos los 7 antígenos	IgM + IgG	100	94
todos los 4 antígenos de IgG	IgM	93	94
todos los 3 antígenos de IgM	IgM	93	94

**EJEMPLO 4**

La firma de remisión de SLE también caracteriza otros grupos de SLE

25 **[0150]** Para determinar si la lista de reactividades de antígenos característica del SLE en remisión podría ser aplicable a SLE. En general, usamos los 7 antígenos que separaron a los sujetos en remisión de los controles saludables (tabla 6) para clasificar a los 14 pacientes con SLE con nefritis activa de lupus y a los 11 pacientes con SLE sin interacción renal.

30 **[0151]** Éstos 25 pacientes con SLE fueron clasificados por medio de un algoritmo de los 3 vecinos más cercanos, basándose en 15 pacientes con SLE en remisión y 16 controles saludables. 23 de estos 25 sujetos con SLE fueron clasificados correctamente, generando una sensibilidad del 92%. Sólo 2 de 26 pacientes con SLE fueron clasificados erróneamente (no se muestra).

35 **[0152]** La figura 2 muestra una representación tridimensional de PCA (proyectada a partir del espacio abarcado por los 7 antígenos separadores) de los sujetos del control saludable y aquellos con varios sub-grupos de SLE. Los controles saludables fueron separados claramente por las 7 reactividades de antígenos de los sujetos con SLE en remisión. Además, los individuos en remisión a largo plazo, con nefritis aguda del lupus, o sin interacción renal estuvieron completamente en superposición. En otras palabras, la lista de remisión de reactividades de antígenos en la tabla 3 constituye una firma de anticuerpos de SLE que incluye a sujetos con SLE con nefritis activa del lupus y aquellos sin una interacción renal. Extraordinariamente, el sujeto marcado por una estrella azul, que fue proyectada hacia el dominio de SLE de la figura 2; el suero de este sujeto fue obtenido cuando ella estuvo en un estado saludable y fue negativo para anticuerpos estándar anti-ADN, pero 8 meses después ella empezó a padecer de síntomas no específicos y se encontró eventualmente, después de 7 meses, que cumplía con los criterios de diagnóstico de SLE. Por lo tanto, la firma de micro ensayo-antígenos también detecta a los SLE pre - clínicos.

Referencias

50 **[0153]**  
 Sherer, Y., Gorstein, A., Fritzler, M.J., Shoenfeld, Y. 2004. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients (explosión de autoanticuerpos en lupus eritematoso sistémico: más de 100 anticuerpos diferentes encontrados en pacientes con SLE). Semin. Arthritis. Rheum. 34:501-37.

55 Criterios publicados por EM Tan et al: Arthritis (Artritis). Rheum. 25:1271, 1982; actualizado por MC Hochberg, Arthritis (Artritis). Rheum. 1997; 40:1725.

Quintana, F.J., Farez, M.F., Viglietta, V., Iglesias, A.H., Merbl, Y., Izquierdo, G., Lucas, M., Basso, A.S., Khoury, S.J.,

- Lucchinetti, C.F., Cohen, I.R., Weiner, H.L. 2008. Antigen microarrays identify unique serum autoantibody signatures associated with different clinical forms and pathologic subtypes of multiple sclerosis (Microensayos de antígenos identifican firmas de autoanticuerpos séricos asociadas con diferentes formas clínicas y subtipos patológicos de esclerosis múltiple). *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 105:18889-94.
- 5 Merbl, Y., Zucker-Toledano, M., Quintana, F.J., Cohen, I.R. 2007. Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics (Humanos recién nacidos manifiestan anticuerpos para auto moléculas definidas detectadas por informática de microensayos de antígenos). *J. Clin. Invest.* 117:712-8.
- 10 Barzilai, O., Sherer, Y., Ram, M., Izhaky, D., Anaya, J.M., Shoenfeld, Y. 2007 Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in autoimmune diseases: are they truly notorious? A preliminary report (Virus Epstein- Barr y citomegalovirus en enfermedades autoinmunes: ¿son realmente notorios? Un informe preliminar). *Ann. N Y Acad. Sci.* 1108:567-77.
- 15 Manolova, I., Dancheva, M., Halacheva, K. 2002. Predominance of IgG1 and IgG3 subclasses of autoantibodies to neutrophil cytoplasmic antigens in patients with systemic lupus erythematosus (Predominancia de las sub-clases de IgG1 e IgG3 de anticuerpos en contra de antígenos neutrófilos citoplásmicos en pacientes con lupus eritematoso sistémico). *Rheumatol. Int.* 21:227-33.
- 20 Sen, D., Isenberg, D.A. 2003. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in systemic lupus erythematosus (Anticuerpos citoplásmicos anti neutrófilos en el lupus eritematoso sistémico). *Lupus* 12:651-8.
- 25 Love, P.E., Santoro, S.A. 1990. Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. Prevalence and clinical significance (Anticuerpos antifosfolípidos: anticardiolipina y el anticoagulante de lupus en lupus eritematoso sistémico (SLE - systemic lupus erythematosus) y en trastornos que no son relacionados con SLE. (Prevalencia y significancia clínica) *Ann. Intern. Med.* 112:682-98.
- 30 Moreland, L.W., Gay, R.E., Gay, S. 1991. Collagen autoantibodies in patients with vasculitis and systemic lupus erythematosus (Anticuerpos de colágeno en pacientes con vasculitis y lupus eritematoso sistémico). *Clin. Immunol. Immunopathol.* 60:412-8.
- 35 Isenberg, D.A., Colaco, C.B., Dudeney, C., Todd-Pokropek, A., Snaith, M.L. 1986. The relationship of anti-DNA antibody idiotypes and anti-cardiolipin antibodies to disease activity in systemic lupus erythematosus (La relación de idiotipos de anticuerpos anti-ADN y anticuerpos anti-cardiolipina en relación a la actividad de enfermedades en el lupus eritematoso sistémico). *Medicina* 65:46-55.
- 40 Li, Q.Z., Zhou, J., Wandstrat, A.E., Carr-Johnson, F., Branch, V., Karp, D.R., Mohan, C., Wakeland, E.K., Olsen, N.J. 2007. Protein array autoantibody profiles for insights into systemic lupus erythematosus and incomplete lupus syndromes (Perfiles de autoanticuerpos de ensayos proteínicos para conceptos para entender al lupus eritematoso sistémico y los síndromes incompletos del lupus). *Clin. Exp. Immunol.* 147:60-70.
- 45 Li, Q.Z., Xie, C., Wu, T., Mackay, M., Aranow, C., Putterman, C., Mohan, C. 2005. Identification of autoantibody clusters that best predict lupus disease activity using glomerular proteome arrays (Identificación de aglutinamientos de anticuerpos que predicen la actividad de la enfermedad de lupus utilizando ensayos de proteomas glomerulares). *J. Clin. Invest.* 115:3428-39.
- 50 Quintana, F.J., Merbl, Y., Sahar, E., Domany, E., Cohen, I.R. 2006. Antigen-chip technology for accessing global information about the state of the body (Tecnología de chips de antígenos para acceder a información global acerca del estado del cuerpo). *Lupus* 15:428-30.
- 55 Quintana, F.J., Hagedorn, P.H., Elizur, G., Merbl, Y., Domany, E., Cohen, I.R. 2004. Functional immunomics: microarray analysis of IgG autoantibody repertoires predicts the future response of mice to induced diabetes (Estudio funcional del sistema inmunológico utilizando métodos relacionados con el genoma: análisis de microensayos de repertorios de autoanticuerpos de IgG predicen la futura respuesta de los ratones a los que se les induce diabetes). *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos.* 101 Suppl 2: 14615-21.
- 60 Wold, R.T., Young, F.E., Tan, E.M., Farr, R.S. 1968. Deoxyribonucleic acid antibody: A method to detect its primary interaction with deoxyribonucleic acid (Anticuerpos de ácidos desoxirribonucleicos: un método para detectar su interacción primaria con el ácido desoxirribonucleico). *Ciencia* 161: 806.
- 65 Duda, R.O., Hart, P.E., Stork, D.G. 2001. *Pattern Classification (Clasificación de Patrones)*. John Wiley and Sons, Inc., New York. 654 pp.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing (Controlar la tasa de falsos descubrimientos: Un método práctico y poderoso para múltiples pruebas). *Journal of the Royal Statistical Society (Revista de la Real Sociedad Estadística) B.* 57:289-300.

[0154] La descripción que se mencionó anteriormente de las secciones específicas revelará completamente la naturaleza general del invento que otras personas pueden, al aplicar un conocimiento actual, modificar fácilmente y/o adaptar para varias aplicaciones tal como secciones específicas sin experimentación indebida y sin apartarse del concepto genérico, y, por lo tanto, aquellas adaptaciones y modificaciones deben y tienen la intención de ser abarcadas dentro del significado y rango de equivalentes de las secciones presentadas. Se debe entender que las frases y terminologías utilizadas en este documento son para propósitos de descripción y no para su limitación. Los significados, materiales y pasos para ejecutar varias de las funciones aquí descritas pueden tomar una variedad de formas alternativas sin apartarse del invento.

LISTAS DE SECUENCIAS

[0155]

<110> YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.

<120> DIAGNÓSTICO DE LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

<130> YEDA/0111 PCT

<150> Estados Unidos Prov 61/303,691

<151> 2010-02-12

<160> 13

<170> versión de patente 3.5

<210> 1

<211> 85

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 1

Thr Ala Ser Glu Pro Glu Asp Lys Ser Pro Arg Val Gln Pro Leu Gly  
1 5 10 15

Thr Gly Leu Gln Gln Arg Pro Arg His Thr Val Ser Pro Ser Pro Ser  
20 25 30

Pro Pro Pro Pro Pro Arg Thr Pro Thr Trp Glu Ser Pro Ala Arg Pro  
35 40 45

Glu Thr Pro Ser Pro Ala Ile Pro Ser His Ser Ser Asn Thr Ala Leu  
50 55 60

Glu Arg Pro Leu Ala Val Gln Leu Ala Arg Lys Arg Thr Ser Ser Glu  
65 70 75 80

Ala Arg Gln Lys Gln  
85

ES 2 560 809 T3

<210> 2  
 <211> 185  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 2  
 10 Met Ala Arg Gly Ala Ala Leu Ala Leu Leu Phe Gly Leu Leu Gly  
 1 5 10 15  
 15 Val Leu Val Ala Ala Pro Asp Gly Gly Phe Asp Leu Ser Asp Ala Leu  
 20 20 Pro Asp Asn Glu Asn Lys Lys Pro Thr Ala Ile Pro Lys Lys Pro Ser  
 35 35 Ala Gly Asp Asp Phe Asp Leu Gly Asp Ala Val Val Asp Gly Glu Asn  
 50 50 55 60  
 25 Asp Asp Pro Arg Pro Pro Asn Pro Pro Lys Pro Met Pro Asn Pro Asn  
 65 70 75 80  
 30 Pro Asn His Pro Ser Ser Ser Gly Ser Phe Ser Asp Ala Asp Leu Ala  
 85 90 95  
 35 Asp Gly Val Ser Gly Gly Glu Gly Lys Gly Gly Ser Asp Gly Gly Gly  
 100 105 110  
 40 Ser His Arg Lys Glu Gly Glu Glu Ala Asp Ala Pro Gly Val Ile Pro  
 115 120 125  
 45 Gly Ile Val Gly Ala Val Val Val Ala Val Ala Gly Ala Ile Ser Ser  
 130 135 140  
 50 Phe Ile Ala Tyr Gln Lys Lys Lys Leu Cys Phe Lys Glu Asn Ala Glu  
 145 150 155 160  
 55 Gln Gly Glu Val Asp Met Glu Ser His Arg Asn Ala Asn Ala Glu Pro  
 165 170 175  
 60 Ala Val Gln Arg Thr Leu Leu Glu Lys  
 180 185

<210> 3  
 <211> 745  
 <212> PRT  
 <213>> Homo sapiens

<400> 3

60

65

ES 2 560 809 T3

Met Gly Val Pro Phe Phe Ser Ser Leu Arg Cys Met Val Asp Leu Gly  
1 5 10 15

5 Pro Cys Trp Ala Gly Gly Leu Thr Ala Glu Met Lys Leu Leu Leu Ala  
20 25 30

10 Leu Ala Gly Leu Leu Ala Ile Leu Ala Thr Pro Gln Pro Ser Glu Gly  
35 40 45

15 Ala Ala Pro Ala Val Leu Gly Glu Val Asp Thr Ser Leu Val Leu Ser  
50 55 60

20 Ser Met Glu Glu Ala Lys Gln Leu Val Asp Lys Ala Tyr Lys Glu Arg  
65 70 75 80

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 560 809 T3

Arg Glu Ser Ile Lys Gln Arg Leu Arg Ser Gly Ser Ala Ser Pro Met  
 85 90 95  
 5  
 Glu Leu Leu Ser Tyr Phe Lys Gln Pro Val Ala Ala Thr Arg Thr Ala  
 100 105 110  
 10  
 Val Arg Ala Ala Asp Tyr Leu His Val Ala Leu Asp Leu Leu Glu Arg  
 115 120 125  
 15  
 Lys Leu Arg Ser Leu Trp Arg Arg Pro Phe Asn Val Thr Asp Val Leu  
 130 135 140  
 20  
 Thr Pro Ala Gln Leu Asn Val Leu Ser Lys Ser Ser Gly Cys Ala Tyr  
 145 150 155 160  
 25  
 Gln Asp Val Gly Val Thr Cys Pro Glu Gln Asp Lys Tyr Arg Thr Ile  
 165 170 175  
 30  
 Thr Gly Met Cys Asn Asn Arg Arg Ser Pro Thr Leu Gly Ala Ser Asn  
 180 185 190  
 35  
 Arg Ala Phe Val Arg Trp Leu Pro Ala Glu Tyr Glu Asp Gly Phe Ser  
 195 200 205  
 40  
 Leu Pro Tyr Gly Trp Thr Pro Gly Val Lys Arg Asn Gly Phe Pro Val  
 210 215 220  
 45  
 Ala Leu Ala Arg Ala Val Ser Asn Glu Ile Val Arg Phe Pro Thr Asp  
 225 230 235 240  
 50  
 Gln Leu Thr Pro Asp Gln Glu Arg Ser Leu Met Phe Met Gln Trp Gly  
 245 250 255  
 55  
 Gln Leu Leu Asp His Asp Leu Asp Phe Thr Pro Glu Pro Ala Ala Arg  
 260 265 270  
 60  
 Ala Ser Phe Val Thr Gly Val Asn Cys Glu Thr Ser Cys Val Gln Gln  
 275 280 285  
 65  
 Pro Pro Cys Phe Pro Leu Lys Ile Pro Pro Asn Asp Pro Arg Ile Lys  
 290 295 300  
 70  
 Asn Gln Ala Asp Cys Ile Pro Phe Phe Arg Ser Cys Pro Ala Cys Pro  
 305 310 315 320  
 75  
 Gly Ser Asn Ile Thr Ile Arg Asn Gln Ile Asn Ala Leu Thr Ser Phe  
 325 330 335

ES 2 560 809 T3

Val Asp Ala Ser Met Val Tyr Gly Ser Glu Glu Pro Leu Ala Arg Asn  
 340 345 350  
 5  
 Leu Arg Asn Met Ser Asn Gln Leu Gly Leu Leu Ala Val Asn Gln Arg  
 355 360 365  
 10  
 Phe Gln Asp Asn Gly Arg Ala Leu Leu Pro Phe Asp Asn Leu His Asp  
 370 375 380  
 15  
 Asp Pro Cys Leu Leu Thr Asn Arg Ser Ala Arg Ile Pro Cys Phe Leu  
 385 390 395 400  
 20  
 Ala Gly Asp Thr Arg Ser Ser Glu Met Pro Glu Leu Thr Ser Met His  
 405 410 415  
 25  
 Thr Leu Leu Leu Arg Glu His Asn Arg Leu Ala Thr Glu Leu Lys Ser  
 420 425 430  
 30  
 Leu Asn Pro Arg Trp Asp Gly Glu Arg Leu Tyr Gln Glu Ala Arg Lys  
 435 440 445  
 35  
 Ile Val Gly Ala Met Val Gln Ile Ile Thr Tyr Arg Asp Tyr Leu Pro  
 450 455 460  
 40  
 Leu Val Leu Gly Pro Thr Ala Met Arg Lys Tyr Leu Pro Thr Tyr Arg  
 465 470 475 480  
 45  
 Ser Tyr Asn Asp Ser Val Asp Pro Arg Ile Ala Asn Val Phe Thr Asn  
 485 490 495  
 50  
 Ala Phe Arg Tyr Gly His Thr Leu Ile Gln Pro Phe Met Phe Arg Leu  
 500 505 510  
 55  
 Asp Asn Arg Tyr Gln Pro Met Glu Pro Asn Pro Arg Val Pro Leu Ser  
 515 520 525  
 60  
 Arg Val Phe Phe Ala Ser Trp Arg Val Val Leu Glu Gly Gly Ile Asp  
 530 535 540  
 65  
 Pro Ile Leu Arg Gly Leu Met Ala Thr Pro Ala Lys Leu Asn Arg Gln  
 545 550 555 560  
 Asn Gln Ile Ala Val Asp Glu Ile Arg Glu Arg Leu Phe Glu Gln Val  
 565 570 575  
 Met Arg Ile Gly Leu Asp Leu Pro Ala Leu Asn Met Gln Arg Ser Arg  
 580 585 590

ES 2 560 809 T3

Asp His Gly Leu Pro Gly Tyr Asn Ala Trp Arg Arg Phe Cys Gly Leu  
 595 600 605  
 5 Pro Gln Pro Glu Thr Val Gly Gln Leu Gly Thr Val Leu Arg Asn Leu  
 610 615 620  
 10 Lys Leu Ala Arg Lys Leu Met Glu Gln Tyr Gly Thr Pro Asn Asn Ile  
 625 630 635 640  
 15 Asp Ile Trp Met Gly Gly Val Ser Glu Pro Leu Lys Arg Lys Gly Arg  
 645 650 655  
 20 Val Gly Pro Leu Leu Ala Cys Ile Ile Gly Thr Gln Phe Arg Lys Leu  
 660 665 670  
 25 Arg Asp Gly Asp Arg Phe Trp Trp Glu Asn Glu Gly Val Phe Ser Met  
 675 680 685  
 30 Gln Gln Arg Gln Ala Leu Ala Gln Ile Ser Leu Pro Arg Ile Ile Cys  
 690 695 700  
 35 Asp Asn Thr Gly Ile Thr Thr Val Ser Lys Asn Asn Ile Phe Met Ser  
 705 710 715 720  
 40 Asn Ser Tyr Pro Arg Asp Phe Val Asn Cys Ser Thr Leu Pro Ala Leu  
 725 730 735  
 45 Asn Leu Ala Ser Trp Arg Glu Ala Ser  
 740 745  
 50 Met Ser Glu Val Pro Val Ala Arg Val Trp Leu Val Leu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 55 Thr Val Gln Val Gly Val Thr Ala Gly Ala Pro Trp Gln Cys Ala Pro  
 20 25 30  
 60 Cys Ser Ala Glu Lys Leu Ala Leu Cys Pro Pro Val Ser Ala Ser Cys  
 35 40 45  
 65 Ser Glu Val Thr Arg Ser Ala Gly Cys Gly Cys Cys Pro Met Cys Ala  
 50 55 60  
 70 Leu Pro Leu Gly Ala Ala Cys Gly Val Ala Thr Ala Arg Cys Ala Arg

<210> 4  
 <211> 259  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4



ES 2 560 809 T3

Arg Arg His Ser Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp  
 20 25 30  
 5  
 Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr Gln Ala Phe Tyr Cys His Gly Asp  
 35 40 45  
 10  
 Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile  
 50 55 60  
 15  
 Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Ser Ile Pro Lys Ala Cys  
 65 70 75 80  
 20  
 Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu  
 85 90 95  
 25  
 Tyr Asp Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Glu Met Val Val Glu Gly  
 100 105 110  
 30  
 Cys Gly Cys Arg  
 115  
 <210> 6  
 <211> 191  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 6  
 40  
 Thr Lys Ala Ser Pro Gly Arg Val Arg Arg Asp Ser Ala Trp Asp Val  
 1 5 10 15  
 45  
 Arg Pro Leu Thr Glu Thr Arg Gly Asp Leu Phe Ser Gly Asp Glu Asp  
 20 25 30  
 50  
 Ser Asp Ser Ser Asp Gly Tyr Pro Pro Asn Arg Gln Asp Pro Arg Phe  
 35 40 45  
 55  
 Thr Asp Thr Leu Val Asp Ile Thr Asp Thr Glu Thr Ser Ala Lys Pro  
 50 55 60  
 60  
 Pro Val Thr Thr Ala Tyr Lys Phe Gly Gln Pro Thr Leu Thr Phe Gly  
 65 70 75 80  
 65  
 Ala Gly Val Asn Val Pro Ala Gly Ala Gly Ala Ala Ile Leu Thr Pro  
 85 90 95  
 70  
 Thr Pro Val Asn Pro Ser Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Thr



ES 2 560 809 T3

Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu  
 65 70 75 80  
 5 Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys  
 85 90 95  
 10 Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe  
 100 105 110  
 15 Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys  
 115 120 125  
 20 Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys  
 130 135 140  
 25 Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His  
 145 150 155 160  
 30 Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Arg  
 165 170 175  
 35 Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg  
 180 185 190  
 40 Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys Met Thr  
 195 200 205  
 45 Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly  
 210 215 220  
 50 Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro His Arg His Lys Phe  
 225 230 235 240  
 55 Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys Arg  
 245 250 255  
 60 Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His  
 260 265 270  
 65 Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr Met  
 275 280 285  
 70 Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln  
 290 295 300  
 75 Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro  
 305 310 315 320

5 Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr Pro  
 325 330 335  
 10 Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro  
 340 345 350  
 15 Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg  
 355 360 365  
 20 Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln  
 370 375 380  
 25 Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln  
 385 390 395  
 30 Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu Asp  
 405 410 415  
 35 Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu  
 420 425 430  
 40 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Ala His Gly Pro Trp Cys Tyr  
 435 440 445  
 45 Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys  
 450 455 460  
 50 Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu Asp His Pro Val Ile  
 465 470 475 480  
 55 Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro Thr  
 485 490 495  
 60 Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His  
 500 505 510  
 65 Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg  
 515 520 525  
 70 Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly  
 530 535 540  
 75 Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu  
 545 550 555 560  
 80 Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu  
 565 570 575

ES 2 560 809 T3

5 Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile  
 580 585 590  
 10 Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser  
 595 600 605  
 15 Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu  
 610 615 620  
 20 Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His  
 625 630 635 640  
 25 His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly Ala  
 645 650 655  
 30 Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu  
 660 665 670  
 35 Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val Ile Val Pro  
 675 680 685  
 40 Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val  
 690 695 700  
 45 Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile Leu Thr Tyr Lys Val  
 705 710 715 720

Pro Gln Ser

40 <210> 9  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 9

50 Gln Ser Ile Val Pro Ala Leu Glu Ile Ala Asn Ala His Arg Lys Pro  
 1 5 10 15

55 Leu Val Ile Ile Ala  
 20

60 <210> 10  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

65 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 10

5 Met Ala Ser Thr Thr Pro Ile Thr Met Glu Asp Leu Gln Lys Ala Leu  
 1 5 10  
 10 Glu Ala Gln Ser Arg Ala Leu Arg Ala Glu Leu Ala Ala Gly Ala Ser  
 20 30  
 15 Gln Ser Arg Arg Pro Arg Pro Pro Arg Gln Arg Asp Ser Ser Thr Ser  
 35 40 45  
 20 Gly Asp Asp Ser Gly Arg Asp Ser Gly Gly Pro Arg Arg Arg Gly  
 50 55 60  
 25 Asn Arg Gly Arg Gly Gln Arg Arg Asp Trp Ser Arg Ala Pro Pro Pro  
 65 70 75 80  
 30 Pro Glu Glu Arg Gln Glu Thr Arg Ser Gln Thr Pro Ala Pro Lys Pro  
 85 90 95  
 35 Ser Arg Ala Pro Pro Gln Gln Pro Gln Pro Pro Arg Met Gln Thr Gly  
 100 105 110  
 40 Arg Gly Gly Ser Ala Pro Arg Pro Glu Leu Gly  
 115 120

<210> 11

<211> 101

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

45 Met Ala Cys Pro Leu Glu Lys Ala Leu Asp Val Met Val Ser Thr Phe  
 1 5 10  
 50 His Lys Tyr Ser Gly Lys Glu Gly Asp Lys Phe Lys Leu Asn Lys Ser  
 20 30  
 55 Glu Leu Lys Glu Leu Leu Thr Arg Glu Leu Pro Ser Phe Leu Gly Lys  
 35 40 45  
 60 Arg Thr Asp Glu Ala Ala Phe Gln Lys Leu Met Ser Asn Leu Asp Ser  
 50 55 60  
 65 Asn Arg Asp Asn Glu Val Asp Phe Gln Glu Tyr Cys Val Phe Leu Ser  
 65 70 75 80  
 70 Cys Ile Ala Met Met Cys Asn Glu Phe Phe Glu Gly Phe Pro Asp Lys



ES 2 560 809 T3

<212> PRT  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> Péptido sintético

10

<400> 13

Val Leu Val Cys Pro Leu Arg Pro Val Glu Arg Phe His Asp Leu Arg  
1 5 10 15

15

Pro Asp Glu Val Ala Asp Leu Phe Gln Thr Thr Gln Arg Val Gly Thr  
20 25 30

20

Val Val Glu Lys His Phe His Gly Thr Ser Leu Thr Phe Ser Met Gln  
35 40 45

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**Reivindicaciones**

- 5 1. Un método para diagnosticar lupus eritematoso sistémico (SLE - systemic lupus erythematosus) en un sujeto, cuyo método comprende:
- 10 (i) determinar la reactividad de los anticuerpos de IgG y de IgM en una muestra obtenida del sujeto con por lo menos 4 antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: IGFBP1, CD99, ácido hialurónico, EBV, ssDNA, dsDNA, MPO, cardiolipina, colágeno III, colágeno IV, actina, BMP4, CMV, F50, HGF, HSP60p18, RV, S100A4, CITED1 y FHIT, determinando, por lo tanto, el patrón de reactividad de la muestra en relación a la pluralidad de antígenos; y
- 15 (ii) comparar el patrón de reactividad de dicha muestra con un patrón de reactividad de control;
- 20 Donde una reactividad incrementada de los anticuerpos de IgG en relación a una pluralidad de antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: ácido hialurónico, EBV, ssDNA, dsDNA, BMP4, F50, HGF y HSP60p18, y/o una reactividad reducida de anticuerpos de IgM en relación a una pluralidad de antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: IGFBP1, CD99, MPO, cardiolipina, colágeno III, colágeno IV, actina, CMV, RV, S100A4, CITED1 y FHIT en comparación con el patrón de reactividad de una muestra de control es una indicación que el sujeto padece de SLE.
- 25 2. El método de la reivindicación uno, donde la pluralidad de antígenos comprende por lo menos 5 antígenos.
3. El método de la reivindicación uno, donde la pluralidad de antígenos comprende por lo menos 6 antígenos.
- 30 4. El método de la reivindicación uno, donde la pluralidad de antígenos comprende por lo menos 7 antígenos.
5. El método de la reivindicación uno, donde la pluralidad de antígenos comprende por lo menos 8 antígenos.
- 35 6. El método de la reivindicación uno, donde la pluralidad de antígenos consiste de IGFBP1, CD99, ácido hialurónico, EBV, ssDNA, dsDNA, MPO, cardiolipina y colágeno III.
7. El método de la reivindicación uno, que comprende el determinar la reactividad de una pluralidad de anticuerpos de IgG y una pluralidad de anticuerpos de IgM en dicha muestra en relación a dicha pluralidad de antígenos.
- 40 8. El método de la reivindicación uno, que comprende el determinar la reactividad de los anticuerpos de IgG en la muestra obtenida del sujeto en relación a una pluralidad de antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: ácido hialurónico, EBV, ssDNA y dsDNA.
9. El método de la reivindicación uno, que comprende el determinar la reactividad de anticuerpos de IgM en la muestra obtenida del sujeto en relación a una pluralidad de antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: CD99, IGFBP1, MPO, cardiolipina y colágeno III.
- 45 10. El método de la reivindicación uno que comprende el determinar la reactividad de anticuerpos de IgM en la muestra obtenida del sujeto en relación a una pluralidad de antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: CD99, IGFBP1, MPO y cardiolipina.
- 50 11. El método de la reivindicación uno, que comprende el determinar la reactividad de anticuerpos de IgM en la muestra obtenida del sujeto en relación a una pluralidad de antígenos seleccionados de un grupo que consiste de: CD99, MPO y colágeno III, donde una regulación/reducción entre el patrón de reactividad de dicha muestra obtenida del sujeto en comparación con el patrón de reactividad de una muestra de control es una indicación que el sujeto padece de SLE en remisión renal.
- 55 12. El método de la reivindicación uno, donde la muestra es una muestra sérica.
13. El método de la reivindicación uno, donde el control es seleccionado de un grupo que consiste de una muestra de por lo menos un individuo saludable, un panel de muestras de control de un conjunto de individuos saludables, y un conjunto almacenado de datos provenientes de individuos de control.
- 60 14. El método de la reivindicación uno, que además comprende la dilución de la muestra 1:10 antes de determinar la reactividad de los anticuerpos en la muestra.
- 65 15. El método de la reivindicación uno, donde dicha pluralidad de antígenos es utilizada en la forma de un ensayo antigénico.

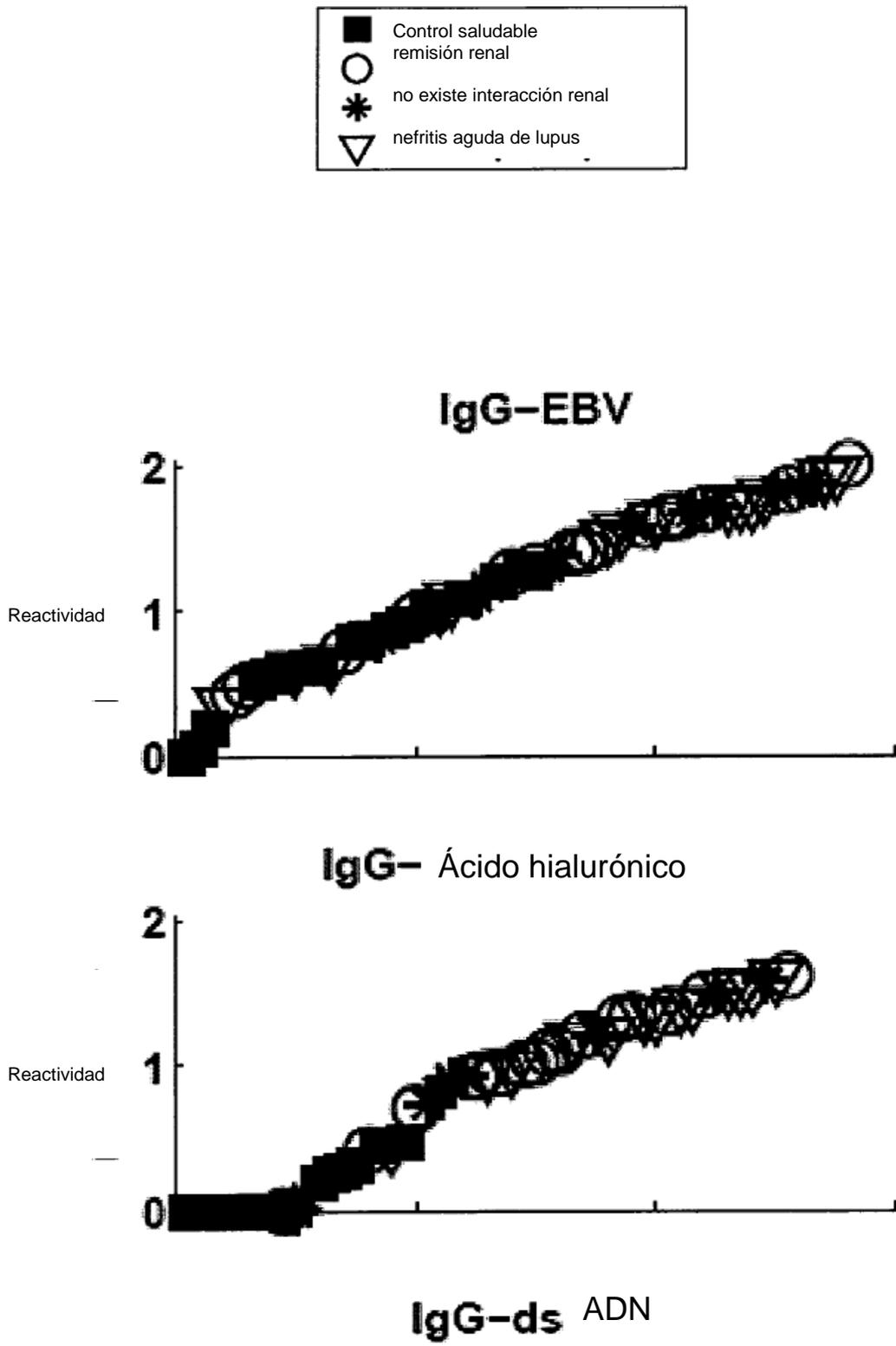


Figura 1

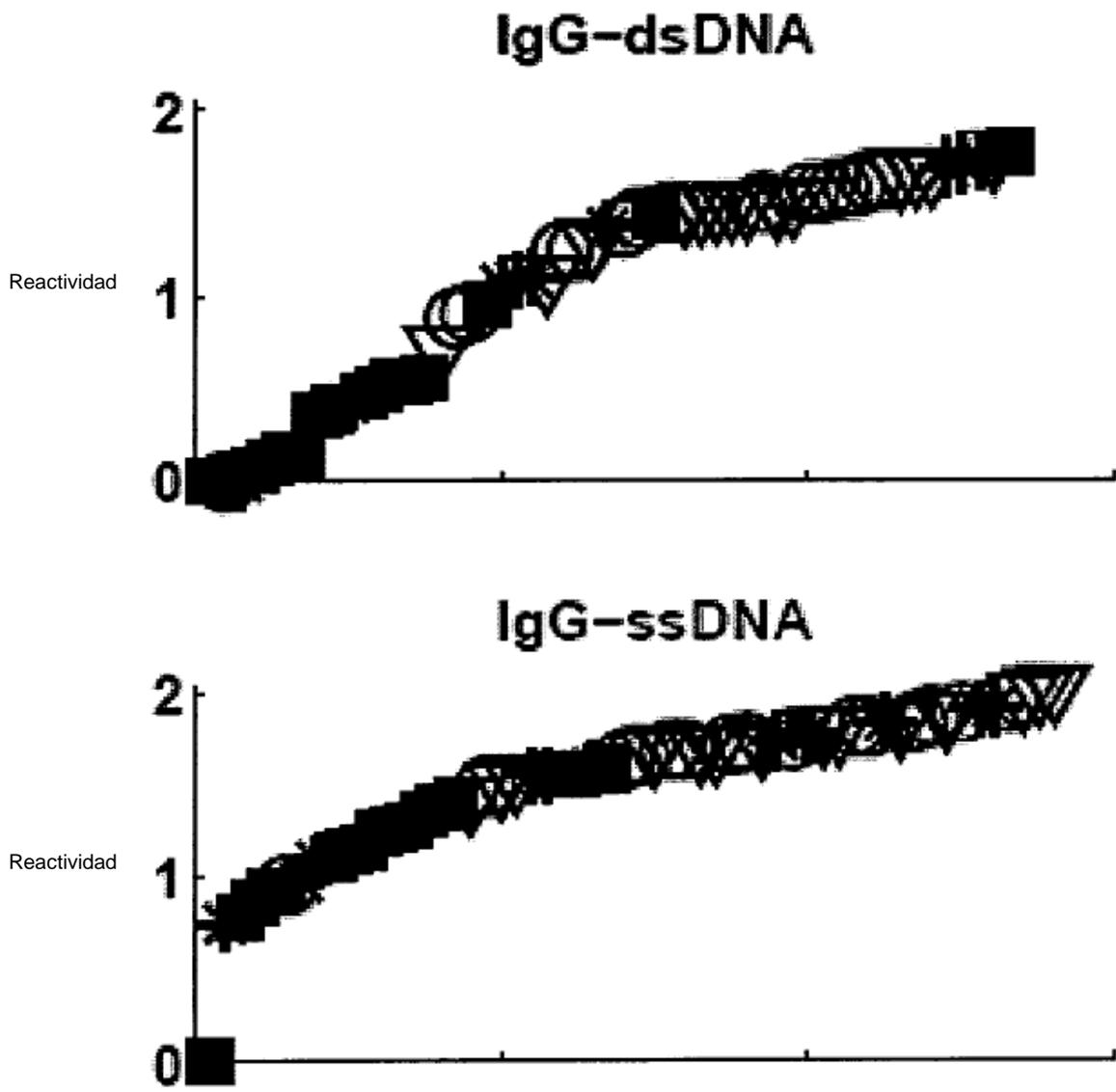


Figura 1 (Cont. 1)

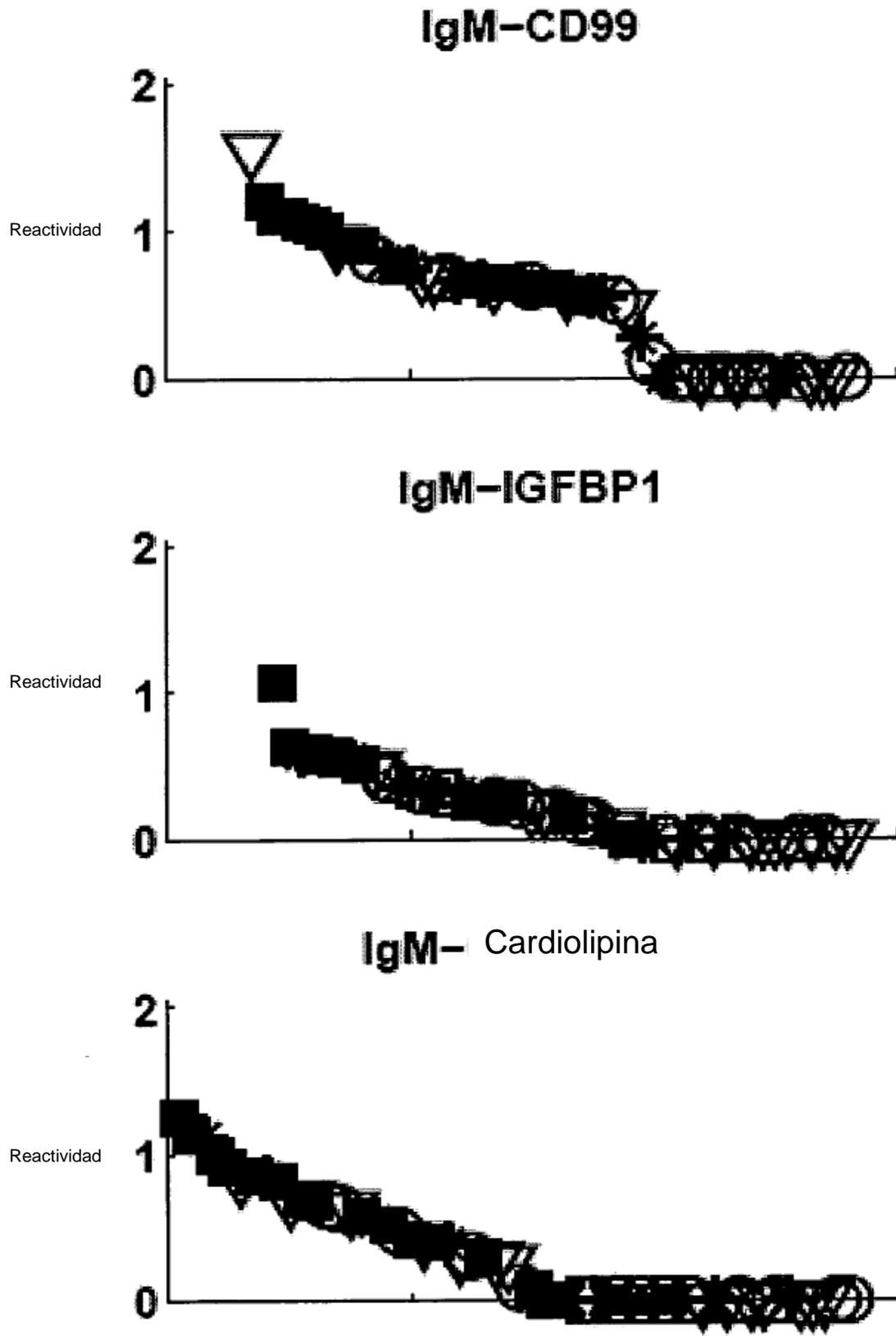


Figura 1 (Cont. 2)

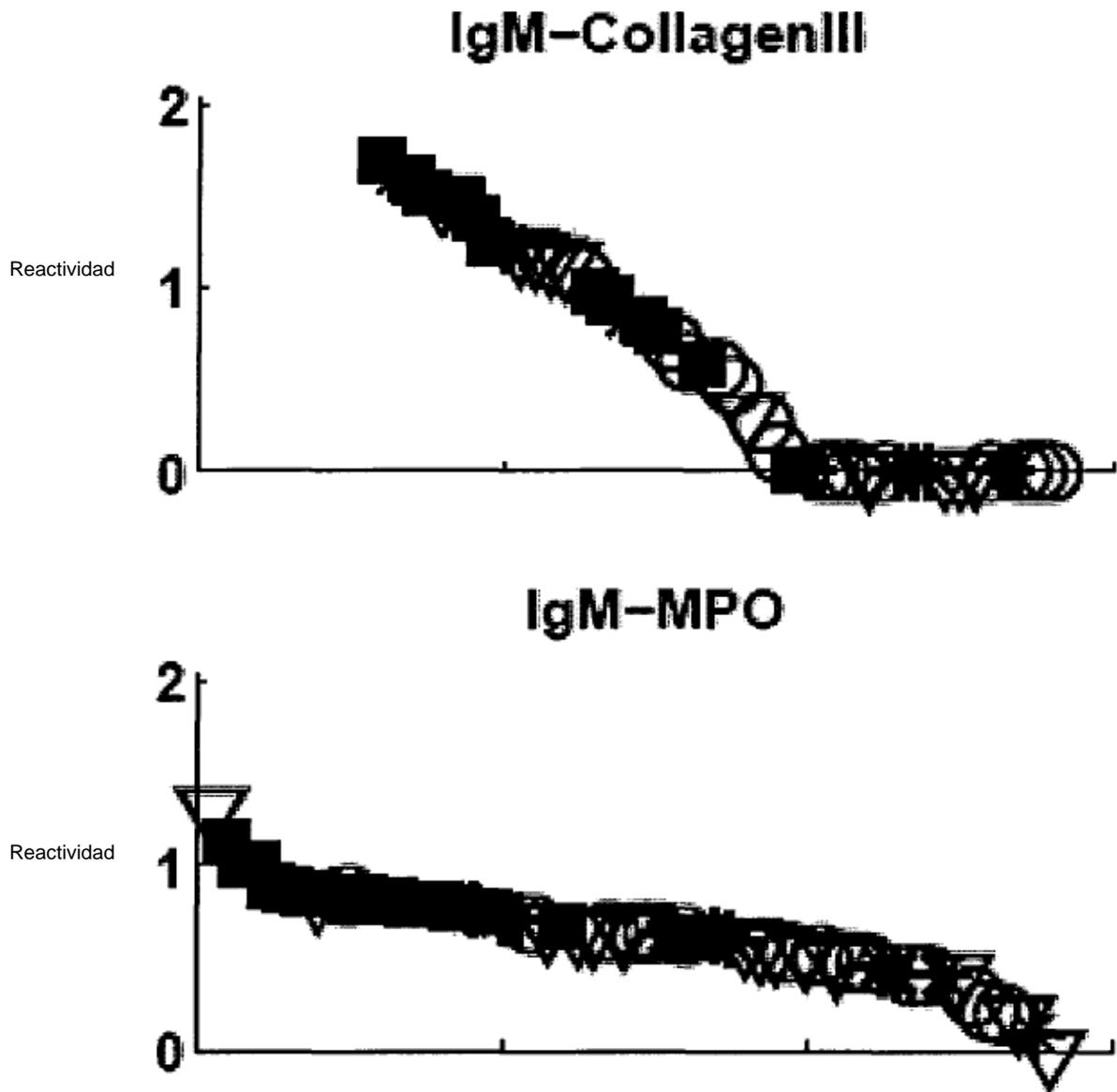


Figura 1 (Cont. 3)

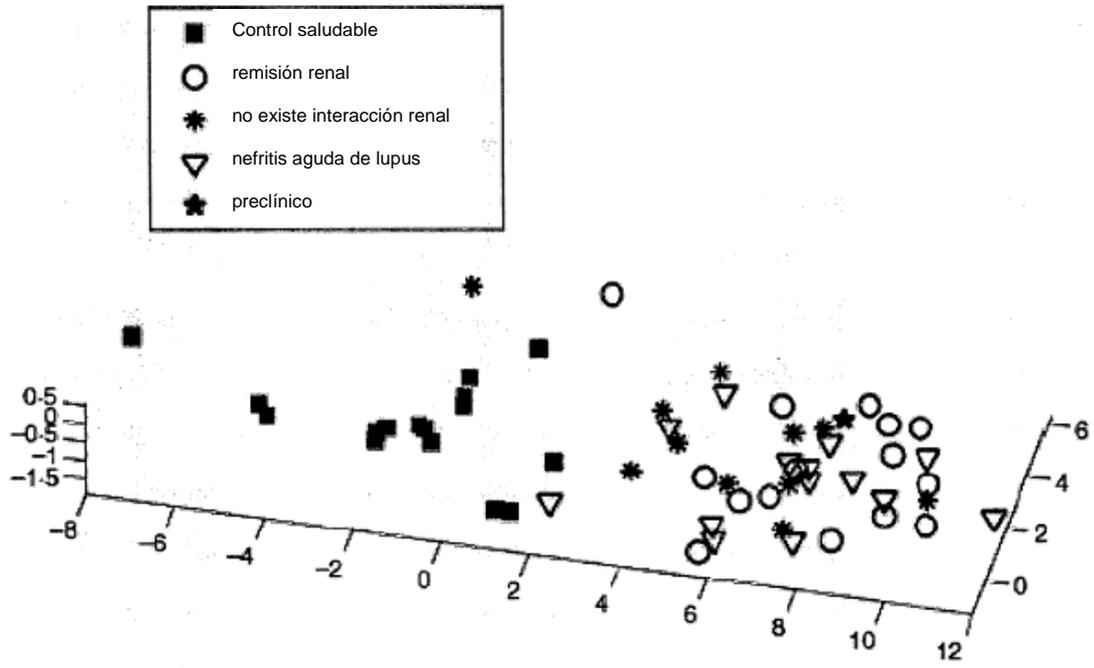


Figura 2