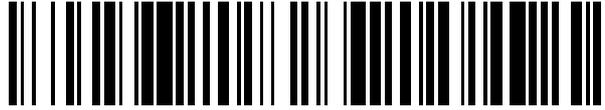


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 762**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2010 E 10822527 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2486407**

54 Título: **Un procedimiento de diagnóstico de cirrosis biliar primaria (PBC) usando nuevos autoantígenos**

30 Prioridad:

**05.10.2009 US 248768 P**

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

**15.04.2016**

73 Titular/es:

**AMBERGEN INC. (50.0%)**

**313 Pleasant Street**

**Watertown, MA 02472, US y**

**MASSACHUSETTS GENERAL HOSPITAL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LIM, MARK J.;**

**OSTENDORFF, HEATHER P.;**

**ROTHSCHILD, KENNETH J. y**

**BLOCH, DONALD B.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 566 762 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Un procedimiento de diagnóstico de cirrosis biliar primaria (PBC) usando nuevos autoantígenos.

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a biología molecular, bioquímica, biología celular, medicina y diagnóstico médico. De forma específica, la invención se refiere a nuevas moléculas de ácidos nucleicos, proteínas y fragmentos de polipéptido codificado por los mismos, anticuerpos policlonales y monoclonales de los mismos, y a procedimientos de uso de las moléculas de ácido nucleico, proteínas/polipéptidos y anticuerpos en diagnóstico, pronóstico, estadificación y regímenes terapéuticos para el control de trastornos autoinmunitarios, enfermedades víricas y cánceres.

**Antecedentes de la invención**

Se han descrito más de 80 enfermedades que están asociadas con la activación de linfocitos autorreactivos y la producción de autoanticuerpos dirigidos frente a tejido normal o componentes celulares (autoantígenos) [von Mühlen y Tan (1995) Semin Arthritis Rheum 24: 323-58; Mellors (2002) 2005]. Denominadas enfermedades autoinmunitarias, de forma colectiva, se estima que afectan a 14,7-23,5 millones de personas, hasta un 8 % de la población total de Estados Unidos y constituyen una importante carga económica y de salud [Jacobson, Gange, Rose y Graham (1997) Clin Immunol Immunopathol 84: 223-43]. Por razones desconocidas, el número de personas afectadas por enfermedades autoinmunitarias está en aumento. Un diagnóstico autoinmunitario significa un periodo de enfermedad y tratamiento, posible daño de órganos, debilitamiento y una mayor probabilidad de mortalidad. La naturaleza crónica y a menudo debilitante de las enfermedades autoinmunitarias da como resultado mal estado de salud del paciente, aumento de los costes médicos, y disminución de la productividad. Las causas fundamentales de la disfunción inmunitaria que apoyan a la enfermedad autoinmunitaria todavía no se conocen bien. En consecuencia, por lo general las enfermedades autoinmunitarias siguen siendo difíciles de diagnosticar, debido a la amplia variabilidad de la presentación clínica, que por lo general implica una inmensidad de síntomas.

Las enfermedades autoinmunitarias son trastornos en los que el sistema inmune de un individuo se dirige y destruye el tejido aparentemente normal. Algunos ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen artritis reumatoide (RA), lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerodermia (SCL), síndrome de Sjogren (SjS), polimiositis (PM), dermatomiositis (DM), enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTD), pénfigo vulgar (PV) y cirrosis biliar primaria (CBP). Algunos autoanticuerpos se dirigen comúnmente frente a proteínas celulares y ácidos nucleicos. En ciertas enfermedades, tales como PV, la diana de los autoanticuerpos se conoce y se cree que el autoanticuerpo desempeña un papel en la patogénesis de la enfermedad. En otras enfermedades, tales como SLE, las dianas de muchos autoanticuerpos diferentes se han identificado pero el papel de los autoanticuerpos en la patogénesis de SLE es todavía incierto.

La detección de autoanticuerpos en el suero de pacientes ayuda en el diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias. El factor reumatoide (anticuerpos IgM dirigidos frente a IgG humana) se detecta en la mayoría de los pacientes con RA y apoya ese diagnóstico en un individuo dado [Kelly, W.N., y col. 1985. Textbook of Rheumatology. 2ª ed. Saunders. pp. 667]. Los anticuerpos antinucleares (ANA) están presentes en aproximadamente un 98 % de los individuos con SLE activa. Aunque los ANA no son específicos para el diagnóstico de SLE, la ausencia de estos anticuerpos argumenta frente al diagnóstico de SLE en un paciente dado [Kelly y col., 1985 mencionado anteriormente pp. 691].

Las enfermedades hepáticas y biliares clasificadas de forma colectiva en las diez primeras causas de mortalidad en las enfermedades crónicas del hígado en Estados Unidos afectan a entre un 5 y un 10 por ciento de los estadounidenses y causan de un 1 a un 2 por ciento de las muertes en Estados Unidos. La enfermedad hepática crónica y cirrosis tienen un coste estimado de 1,6 billones de dólares al año [(2004)]. Las causas generales de las enfermedades hepáticas y biliares incluyen agentes infecciosos, defectos hereditarios, trastornos metabólicos, alcohol, toxinas y sustancias tóxicas ambientales. Las enfermedades hepáticas más comunes son la hepatitis C crónica, enfermedad hepática alcohólica, enfermedad de hígado graso no alcohólico, hepatitis B crónica, enfermedades hepáticas autoinmunitarias y enfermedades hepáticas inducidas por fármacos. Muchas de estas afecciones se pueden prevenir o tratar, pero si no se hace, pueden conducir a lesión hepática progresiva, fibrosis hepática y por último cirrosis, hipertensión portal, enfermedad hepática en fase terminal y, en algunos casos, cáncer de hígado. En la actualidad, la única terapia para la enfermedad hepática en fase terminal es el trasplante de hígado. En Estados Unidos se realizan cada año más de 5.000 trasplantes de hígado. Al menos 17.000 personas están en una lista de espera para trasplante de hígado y cada año mueren hasta 1.500 mientras esperan [(2004)]. La investigación de las enfermedades del hígado presenta muchas necesidades desafiantes. Las enfermedades autoinmunitarias del hígado son: cirrosis biliar primaria (PBC), hepatitis autoinmunitaria y colangitis esclerosante primaria. Todas estas enfermedades crónicas del hígado pueden conducir a enfermedad hepática en fase terminal. De forma colectiva, las enfermedades hepáticas autoinmunitarias son responsables de un 13 % de los trasplantes de hígado en adultos al año en Estados Unidos [(2004)].

La PBC es una enfermedad hepática colestásica progresiva, con una prevalencia estimada en Estados Unidos de

aproximadamente 40 adultos por cada 100.000 habitantes (incidencia de 2,7 por 100.000 habitantes en Estados Unidos) [Kim, Lindor y col. (2000) *Gastroenterology* 119: 1631-6; Feld y Heathcote (2003) *J Gastroenterol Hepatol* 18: 1118-28; 2004]. Las mujeres con edades entre 40 y 65 se ven afectadas de forma predominante por la PBC, con una proporción de mujeres con respecto a hombres de 9:1 [Kaplan y Gershwin (2005) *N Engl J Med* 353: 1261-73], como es habitual para la enfermedad autoinmunitaria. La PBC se caracteriza por la destrucción progresiva gradual de los conductos biliares intrahepáticos que conducen a fibrosis hepática e insuficiencia hepática (revisado en [Kaplan (1996) *N Engl J Med* 335: 1570-80; Heathcote (2000) *Hepatology* 31: 1005-13; Kaplan (2002) *Gastroenterology* 123: 1392-4; Talwalkar y Lindor (2003) *Lancet* 362: 53-61]). La PBC es una indicación Significativa para trasplante de hígado, y los pacientes con PBC constituyen un 11 % de todos los pacientes sometidos a trasplante de hígado la cirrosis [Milkiewicz (2008) *Clin Liver Dis* 12: 461-72; xi]. Las actividades de las isoenzimas I-IV de hexoquinasa se determinaron en el hígado humano normal y en la enfermedad hepática alcohólica y cirrosis biliar primaria después del fraccionamiento por FPLC de los sobrenadantes de alta velocidad en Mono-Q con un gradiente lineal de NaCl. En el hígado humano de control, las actividades de la hexoquinasa eran I, 3,6; II, 0,7; III, 3,5; IV, 4,8 (mUnidades/mg de proteína sobrenadante). En la enfermedad hepática alcohólica y la cirrosis biliar primaria, la actividad de la hexoquinasa IV se suprimió a menos de un 10 % de la actividad de control y la actividad de la hexoquinasa I se incrementó 3 veces. La actividad de la hexoquinasa II aumentó ~7 veces en la enfermedad hepática alcohólica mientras que la actividad de la hexoquinasa II se mantuvo sin cambios en la cirrosis [Lowe y col. (1998) *Biochimica Biophysica Acta* 1379: 134-142]

El tratamiento de la PBC se consigue con ácido ursodesoxicólico (ursodiol), un ácido biliar natural que no es tóxico para el hígado, para reemplazar los ácidos biliares que se reducen por la PBC. Aunque los mecanismos no se entienden completamente, este tratamiento reduce en última instancia la acumulación intracelular de otros ácidos biliares tóxicos para el hígado (que se causó por la destrucción de los conductos biliares). Aunque el ursodiol ralentiza la progresión a cirrosis, el tratamiento con ursodiol funciona mejor cuando se aplica temprano en el curso de la PBC, resaltando la importancia de un ensayo de diagnóstico de PBC rápido, fiable. De hecho, un estudio mostró que el tratamiento con ursodiol en los estadios III y IV no daba como resultado una disminución equitativa de la progresión del hígado mientras que los pacientes tratados a tiempo en los estadios I y II histológicos sí mostraban una disminución importante de la destrucción del hígado con el tratamiento con ursodiol. Esto resalta la necesidad de un diagnóstico precoz de la PBC, para permitir un tratamiento médico rápido [Heathcote (2000) *Hepatology* 31: 1005-13; Poupon, Lindor, Pares, Chazouilleres, Poupon y Heathcote (2003) *J Hepatol* 39: 12-6].

Aproximadamente la mitad de los pacientes con PBC presentan en primer lugar una prueba de sangre anómala que desencadena el diagnóstico final de PBC. En general, la prueba de diagnóstico se activa inicialmente mediante las pruebas de función hepática anómala y signos de enfermedad biliar, seguido de prueba para autoanticuerpos antimitocondriales en suero (AMA), para lo que se calcula que de un 87 % a un 95 % de los pacientes con PBC tienen una prueba positiva [Heathcote (2000) *Hepatology* 31: 1005-13; Yang, Yu, Nakajima, Neuberger, Lindor y Bloch (2004) *Clin Gastroenterol Hepatol* 2: 1116-22; Kaplan y Gershwin (2005) *N Engl J Med* 353: 1261-73; Liu, Shi, Zhang, Zhang y Gao (2008) *Liver Int* 28: 233-9]. Los ensayos de formación de imágenes de conductos biliares se usan para descartar otras causas de enfermedad del tracto biliar, y las biopsias de hígado confirman el diagnóstico y proporcionan un indicador del estadio de la enfermedad (basándose en el grado de fibrosis). Los datos disponibles con respecto a la patogénesis inmunomediada de la PBC se han descrito y analizado con especial atención a autoanticuerpos y linfocitos T autorreactivos, y se presentaron recientes evidencias que indican un papel ya sea para productos químicos xenobióticos o nuevos agentes infecciosos en la inducción de la enfermedad [Selmi y col. (2005) *Clin Rev Allergy & Immunol* 28: 73-81].

Sin embargo, aproximadamente la otra mitad de los pacientes con PBC presentará solamente una diversidad de síntomas físicos relativamente no específicos, destacando las dificultades que afronta el médico general o especialista responsable del diagnóstico. Los más comunes de estos síntomas son prurito, fatiga y dolor musculoesquelético [Prince, Chetwynd, Newman, Metcalf y James (2002) *Gastroenterology* 123: 1044-51]. Además, se pueden encontrar numerosos trastornos autoinmunitarios en asociación con PBC, incluyendo hepatitis autoinmunitaria (AIH) [Czaja (2006) *J Hepatol* 44: 251-2], disfunción tiroidea, síntomas de sicca, síndrome de Raynaud, lupus eritematoso sistémico (SLE) y artritis reumatoide [Heathcote (2000) *Hepatology* 31: 1005-13; Gershwin, Selmi, Worman, Oro, Watnik, Utts, Lindor, Kaplan y Vierling (2005) *Hepatology* 42: 1194-202]. En un estudio, se encontró que un 19 % de los pacientes con PBC tenían características de otra enfermedad [Czaja (1998) *Hepatology* 28: 360-5], enturbiando de ese modo el diagnóstico. Como algo preocupante, para muchos pacientes no se puede pedir la prueba apropiada debido a la etiología desconocida, especialmente cuando los pacientes presentan síntomas vagos de prurito o dolor en las articulaciones.

Los autoanticuerpos tienen el potencial de servir no solamente como herramientas de diagnóstico, sino también como precursores del desarrollo de PBC en el futuro. De hecho, se ha mostrado que los anticuerpos antimitocondriales (AMA) aparecen antes de las manifestaciones clínicas y diagnóstico de PBC [Metcalf, Mitchison, Palmer, Jones, Bassendine y James (1996) *Lancet* 348: 1399-402]. Esto demuestra que puede ser posible diagnosticar la PBC en un estadio más temprano usando biomarcadores de autoanticuerpos. La evidencia serológica de la PBC son los AMA, que se pueden detectar en un 87-95 % de los pacientes [Kaplan (1996) *N Engl J Med* 335: 1570-80; Nishio, Keeffe y Gershwin (2002) *Semin Liver Dis* 22: 291-302]. Los principales autoantígenos dirigidos por estos AMA incluyen las subunidades E2 del complejo de la piruvato deshidrogenasa. (PDC-E2), el complejo 2-oxo-ácido deshidrogenasa de cadena ramificada (BCOADC-E2) y el complejo 2-oxo-glutarato

deshidrogenasa (OGDC-E2) [Fussey, Guest, James, Bassendine y Yeaman (1988) Proc Natl Acad Sci U S A 85: 8654-8; Nishio, Keeffe y col. (2002) Semin Liver Dis 22: 291-302].

Los autoanticuerpos antinucleares (ANA) están presentes en ~50 % de los pacientes con PBC. Los autoanticuerpos que reconocen proteínas del complejo del núcleo nuclear y múltiples puntos nucleares (MND) son marcadores útiles de PBC en pacientes negativos para AMA, con una prevalencia de un 13-44 % [Manuel Lucena, Montes Cano, Luis Caro, Respaldiza, Alvarez, Sanchez-Roman, Nunez-Roldan y Wichmann (2007) Ann N Y Acad Sci 1109: 203-11]. Además, los ANA pueden servir como indicadores de pronóstico, con anticuerpos de glicoproteína 210 (gp210) de poro anticentrómero y/o antinuclear que están asociados con insuficiencia hepática en la PBC [Yang, Yu y col. (2004) Clin Gastroenterol Hepatol 2: 1116-22; Nakamura, Kondo y col. (2007) Hepatology 45: 118-27].

El cuerpo nuclear (NB, también conocido como dominio nuclear 10, dominio oncogénico de PML, y cuerpo de Kr) es un orgánulo nuclear cuya función se desconoce [Ascoli, C. A., y Maul, G. G., J. Cell. Biol. 112: 785-795 (1991); Brasch, K., y Ochs, R. L., Exp. Cell Res. 202: 211-223 (1992); Dyck, J. A. y col., Cell 76: 333-343 (1994)]. Usando tinción inmunohistoquímica, los NB aparecen como 5 a 30 regiones en forma de puntos, separadas punteadas dentro del núcleo. El NB es distinto de otros dominios nucleares incluyendo los que participan en la replicación del ADN y el procesamiento del ARNm. Además, los componentes del NB no se colocan con cinetocoros o centrómeros [Brasch, K., y Ochs, R. L., Exp. Cell Res. 202: 211-223 (1992)]. El número de NB en la célula, y la intensidad de la tinción de anticuerpos de estas estructuras, aumenta respuesta a estímulos que incluyen interferones (IFN), choque térmico e infección vírica [Ascoli, C. A., y Maul, G. G., J. Cell. Biol. 112: 785-795(1991)].

El NB es una diana de autoanticuerpos en el suero de pacientes con la enfermedad autoinmunitaria cirrosis biliar primaria (PBC). Aproximadamente un 40 % de los pacientes con PBC tienen anticuerpos dirigidos frente a esta estructura [Evans, J., y col., Arthr. Rheum. 347: 31-736 (1991); Szostecki, C. y col., Scand. J. Immunol. 36: 555-564 (1992)]. El suero de los pacientes con PBC se usó para identificar y caracterizar un componente del NB de 100 kDa que se denominó Sp100 (Punteado, 100 kDa) [Szostecki, C. y col., J. Immunol. 145: 4338-4347 (1990)]. Se ha demostrado que la fusión de Sp100 con el dominio de unión de ADN de LexA activa la transcripción de genes en *Saccharomyces cerevisiae*, y se ha sugerido que Sp100 puede participar en la activación de la transcripción de regiones específicas en el genoma [Xie, K. y col., Mol. Cell. Biol. 13:6170-6179 (1993)].

Un segundo componente del NB, denominado NDP52, se caracterizó usando un anticuerpo monoclonal murino que se hizo reaccionar con el NB [Korioth, F., y col., J. Cell. Biol. 130: 1-13 (1995)]. Un ADNc que codifica NDP52 se identificó y la secuencia de aminoácidos predicha contenía cremallera de leucina con superarrollamiento, y motivos dedo de cinc. Uno o más de estos dominios pueden estar implicados en interacciones entre NDP52 y otros componentes del NB [Korioth, F., y col., J. Cell. Biol. 130: 1-13 (1995)].

Un tercer componente del NB, PML, fue identificado por varios investigadores que estudiaban la translocación de t(15; 17) asociado con leucemia promielocítica aguda humana (APL) [de The, H. y col., Nature (Londres) 347: 558-561 (1990); Borrow, J. y col., Science 249: 1577-1580 (1990); Longo, L. y col., J. Exp. Med. 172: 1571-1575 (1990); Kakizuka, A. y col., Cell 66: 663-674 (1991)]. En esta translocación, la porción amino terminal de PML se fusiona con el receptor alfa de ácido retinoico. Se encontró que PML se colocaba con Sp100 en el NB [Weis, K. y col., Cell 76: 345-356 (1994); Koken, M. H. M. y col., EMBO 13: 1073-1083 (1994)]. Parece que la expresión de la proteína de fusión de PML-alfa en células de APL interrumpe el NB; en estas células, los antígenos de NB se detectan en numerosas regiones más pequeñas en el núcleo descritos como "micropuntitos". El tratamiento de células de APL con ácido retinoico (RA) da como resultado la diferenciación de células precursoras mieloides y la reforma de los NB [Dyck, J. A. y col., Cell 76: 333-343 (1994); Weis, K. y col., Cell 76: 345-356 (1994); Koken, M. H. M. y col., EMBO 13: 1073-1083 (1994)]. En pacientes con APL, el tratamiento con RA da como resultado la diferenciación de células leucémicas y la remisión temporal de la enfermedad [Warrell, R. P. y col., N. Eng. J. Med. 329: 177-189 (1993)].

Sin embargo, es importante tener en cuenta que ANA también se encuentran en una diversidad de otros trastornos autoinmunitarios prevalentes y una amplia gama de tipos de cáncer [Bei, Masuelli, Palumbo, Modesti y Modesti (2008) Cancer Lett].

La inmunofluorescencia indirecta (IIF) y el inmunoensayo en fase sólida son los dos formatos usados para establecer la presencia o ausencia de autoanticuerpos en pacientes. Ambos procedimientos tienen sus ventajas y desventajas como se analiza a continuación:

Durante las últimas décadas, la inmunofluorescencia indirecta (IIF) ha sido el procedimiento de elección por los médicos para la detección de autoanticuerpos presentes en el suero de pacientes autoinmunitarios. Es importante destacar que sigue siendo el criterio de referencia para los ensayos de AMA y ANA, incluyendo de CBP. Por lo general, el suero del paciente se diluye en serie en incrementos de dos veces y se permite que se una a un sustrato de células en un portaobjetos de microscopio (por ejemplo, células HEp-2 de hígado), que a continuación se tiñen con fluorescencia para detectar autoanticuerpos unidos y un técnico entrenado lo examina bajo el microscopio para identificar los patrones de tinción celular/tisular. La IIF tiene la ventaja de que, como un sustrato basado en células/tejido, puede, en teoría, incluir de forma "universal" a todos los autoantígenos celulares (en espera de su expresión y conservación en el sustrato). Esto, en parte, se pone en evidencia por la alta sensibilidad de diagnóstico del ensayo de IIF, por ejemplo, de un 93 % (ANA) para el lupus eritematoso sistémico (SLE) [Solomon, Kavanaugh y

Schur (2002) *Arthritis Rheum* 47: 434-44] y de un 90 % (AMA) para PBC [Tanaka, Miyakawa, Luketic, Kaplan, Storch y Gershwin (2002) *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 48: 295-9].

5 Aunque el AMA basado en IIF es un marcador sensible para la PBC, la compensación puede ser la especificidad. Algunos pacientes asintomáticos se han considerado positivos para AMA, y aunque una gran parte solamente desarrolla síntomas años después, algunos nunca desarrollan síntomas en absoluto [Metcalf, Mitchison y col., (1996) *Lancet* 348: 1399-402]. Además, un estudio encontró que un 34 % de los pacientes con AIH dio positivo en los ensayos para AMA [Nezu, Tanaka, Yasui, Imamura, Nakajima, Ishida y Takahashi (2006) *J Gastroenterol Hepatol* 21: 1448-54].

10 Además, el ensayo de IIF es problemático en general cuando se usa como una herramienta de identificación sistemática de diagnóstico de rutina, ya que es difícil de estandarizar debido a variaciones en el sustrato y en el proceso de fijación, variaciones en el aparato de microscopía, y debido a la interpretación muy subjetiva de los resultados [Jaskowski, Schroder, Martins, Mouritsen, Litwin y Hill (1996) *Am J Clin Pathol* 105: 468-73]. La declaración de consenso en 2004 del Comité de Serología Autoinmunitaria del Grupo Internacional de Hepatitis Autoinmunitaria (IAIHG) recomendó que la IIF se puede realizar en tres órganos diferentes de roedores [Vergani, Alvarez, Bianchi, Cancado, Mackay, Manns, Nishioka y Penner (2004) *J Hepatol* 41: 677-83]. Tanto los AMA como los anticuerpos microsomales-1 de riñón anti-hígado (LKM1) tiñen los túbulos renales del riñón, con diferencias solamente evidentes para el ojo entrenado, y esta confusión puede conducir a un diagnóstico de hepatitis autoinmunitaria (AIH) en lugar de PBC [Bogdanos, Invernizzi, Mackay y Vergani (2008) *World J Gastroenterol* 14: 3374-87]. Además, algunos autoantígenos se pierden (no se reconocen) por difusión o desnaturalización durante el proceso de fijación de la IIF. Otro factor de confusión es que a menudo múltiples enfermedades autoinmunitarias se pueden producir en conjunto en el mismo paciente, y los patrones de IIF de solapamiento pueden conducir a confusión en el diagnóstico correcto de cada una de ellas [Assassi, Fritzler y col., (2009) *J Rheumatol*; Norman, Bialek, Encabo, Butkiewicz, Wiechowska-Kozłowska, Brzosko, Shums y Milkiewicz (2009) *Dig Liver Dis* 41: 762-4]. Por último, la IIF es lenta, laboriosa y no susceptible de automatización de alto rendimiento [Ulvestad, Kanestrom, Madland, Thomassen, Haga y Vollset (2000) *Scand J Immunol* 52: 309-15].

Aunque la IIF sigue siendo el criterio de referencia en el ensayo de AMA, el inmunoensayo en fase sólida, tal como ELISA (Análisis de Inmunoabsorción Ligada a Enzimas), está ganando popularidad, especialmente en los laboratorios de alto rendimiento [Fritzler y Fritzler (2006) *Curr Med Chem* 13: 2503-12]. Estos procedimientos tienen la ventaja de automatización de alto rendimiento, alta sensibilidad analítica, puntuación puramente objetiva, fiabilidad y la capacidad de someter a ensayo especies específicas de autoantígenos, incluyendo de manera multiplexada [Fritzler y Fritzler (2006) *Curr Med Chem* 13: 2503-12]. Con una resolución al nivel del antígeno individual, estos procedimientos tienen el potencial de una mayor especificidad de la enfermedad, si se elige el panel de marcadores correcto. El inconveniente, sin embargo, es que un número suficiente de autoantígenos tiene que ser tanto descubierto como validado clínicamente para que coincida con la sensibilidad de diagnóstico del ensayo de IIF basado en sustrato celular.

En un ejemplo de un inmunoensayo en fase sólida comercial de PBC, INOVA Diagnostics Inc. (San Diego, CA) comercializa el ensayo MIT3, un inmunoensayo basado en ELISA aprobado por la FDA para PBC basado en la detección de los AMA. El MIT3 usa una proteína recombinante que contiene los epítomos inmunodominantes de las tres subunidades de E2 del complejo de piruvato deshidrogenasa [Moteki, Leung, Coppel, Dickson, Kaplan, Munoz y Gershwin (1996) *Hepatology* 24: 97-103]. El objetivo general de estos ensayos es imitar el ensayo de AMA basado en IIF celular para PBC, pero con todos los beneficios mencionados anteriormente de los inmunoensayos en fase sólida de antígenos individuales. Aún así, este ensayo solo pretende de ser una ayuda de diagnóstico, junto con los hallazgos clinicopatológicos para PBC. En un estudio, el ensayo de ELISA de MIT3 basado en AMA presentaba una sensibilidad de diagnóstico informada de un 81,6 %, sin embargo, es importante señalar que las muestras de suero con enfermedad de PBC negativo para AMA se excluyeron [Gabeta, Norman, Liaskos, Papamichalis, Zografos, Garagounis, Rigopoulou y Dalekos (2007) *J Clin Immunol* 27: 378-87]. En otro estudio, se demostró que el ensayo de MIT3, por ejemplo, carece de todos los autoantígenos mitocondriales necesarios para la sensibilidad máxima del diagnóstico de PBC [Dahnrich, Pares y col., (2009) *Clin Chem* 55: 978-85].

50 Esto pone de relieve la necesidad del descubrimiento y validación de biomarcadores de autoantígenos adicionales para usó en inmunoensayos en fase sólida para el diagnóstico óptimo de enfermedades autoinmunitarias como PBC. Los procedimientos más eficaces para el descubrimiento de autoantígenos se basan en proteómica. La proteómica se puede definir como el análisis global (por ejemplo, en paralelo o simultáneo) de todo el complemento de proteína expresada del genoma [Wasinger, Cordwell y col., (1995) *Electrophoresis* 16: 1090-4]. Algunos procedimientos de proteómica permiten el descubrimiento de nuevos autoantígenos de una manera imparcial. Algunos procedimientos de proteómica habituales para el descubrimiento de nuevos autoantígenos incluyen SEREX (identificación serológica de antígenos mediante clonación de expresión recombinante) [Krebs, Kurrer, Sahin, Tureci y Ludewig (2003) *Autoimmun Rev* 2: 339-45] y micromatrices de proteoma humano ("chips", normalmente las dimensiones de los portaobjetos de microscopio convencionales, que contienen miles de proteínas humanas recombinantes purificadas impresas en su superficie en una matriz ordenada de aplicaciones puntuales microscópicas, por ejemplo, aplicaciones puntuales de 100 micrómetros de diámetro) [Robinson, DiGennaro y col., (2002) *Nat Med* 8: 295-301; Robinson, Steinman y Utz (2002) *Arthritis Rheum* 46: 885-93].

## **Sumario de la invención**

La invención se define mediante las características de la reivindicación independiente. Algunas realizaciones precedentes se enumeran en las reivindicaciones dependientes.

5 La presente invención se refiere a procedimientos para uso de los nuevos autoantígenos (Tablas I y V) de hexoquinasa 1 (HK1) y/o kelch-like 12 (KLHL12) humanas, o fragmentos de los mismos que comprenden un epítipo, en el diagnóstico, pronóstico, estadificación y regímenes terapéuticos de la enfermedad hepática autoinmunitaria, Cirrosis Biliar Primaria (PBC). La presente invención también se refiere a procedimientos para uso de homólogos, miembros de familia, variantes de transcrito e isoformas (por ejemplo, Tabla VI), preferentemente idénticos en al menos un 70 %, más preferentemente idénticos en al menos un 90 % y lo más preferentemente idénticos en al menos un 95 %, de la hexoquinasa 1 (HK1) y/o kelch-like 12 (KLHL12) humanas, o fragmentos de los mismos que comprenden un epítipo, en el diagnóstico, pronóstico, estadificación y regímenes terapéuticos de la enfermedad hepática autoinmunitaria, Cirrosis Biliar Primaria (PBC).

15 Se desvelan anticuerpos aislados que se unen de forma específica a los polipéptidos descritos anteriormente, o a fragmentos de los mismos que comprenden epítipo. Los anticuerpos proporcionados en el presente documento pueden ser policlonales o monoclonales, se pueden purificar por afinidad, se pueden inmovilizar en un soporte sólido, y se pueden etiquetar de forma detectable. Se desvelan procedimientos para detectar la presencia de una enfermedad autoinmunitaria en un animal, preferentemente un ser humano, que comprende las etapas de aislar una muestra de fluido corporal, preferentemente sangre, suero o plasma, del animal, incubar el suero con un polipéptido aislado de HK1 y/o KLHL12 descritos anteriormente, y detectar la unión de los autoanticuerpos en la muestra de suero del polipéptido aislado. Se desvelan procedimientos alternativos para detectar la presencia de una enfermedad autoinmunitaria en un animal que comprende las etapas de aislar una muestra de fluido corporal del animal, preferentemente sangre, suero o plasma, e inmovilizar componentes del suero en un soporte sólido, poner en contacto los componentes del suero inmovilizados con un polipéptido aislado descrito anteriormente en condiciones que favorezcan la formación de un complejo entre los componentes del suero y el polipéptido aislado, poner en contacto el complejo formado con un anticuerpo que se une de forma específica a HK1 y/o KLHL12, y detectar la unión del anticuerpo al complejo. Algunas enfermedades autoinmunitarias que se pueden diagnosticar con los procedimientos de la presente invención incluyen cirrosis biliar primaria (PBC) y lupus sistémico eritematoso (SLE). Algunos cánceres que se pueden diagnosticar con los procedimientos de la presente invención incluyen cáncer colorrectal (CRC). Se desvelan procedimientos para determinar el pronóstico, estadio de la enfermedad y regímenes de tratamiento usando los procedimientos mencionados anteriormente para detectar autoanticuerpos frente a HK1 y/o KLHL12.

25 En una realización preferente, se usan inmunoensayos heterogéneos u homogéneos, mono-plex o multiplex, para detectar autoanticuerpos presentes en fluidos corporales dirigidos frente a dichos autoantígenos. Otras realizaciones preferentes de la presente invención serán evidentes para un experto habitual en la materia a la vista de los siguientes dibujos (Figuras) y descripción de la invención, y de las reivindicaciones.

## **Experimental**

**Ejemplo 1:** Descubrimiento Basado en Micromatriz de Proteoma de Nuevos Autoantígenos de Cirrosis Biliar Primaria (PBC)

### *Identificación Sistemática de Suero en Micromatrices*

40 Se identificaron sistemáticamente sueros de pacientes frente a micromatrices comerciales de proteoma humano comprendidos por ~8.000 proteínas recombinantes humanas (expresadas de forma eucariota) únicas impresas por duplicado a densidad elevada a un "chip" del tamaño de un portaobjetos de microscopio convencional (Human ProtoArray® v4.0, Invitrogen, Carlsbad, CA) [Sheridan (2005) Nat Biotechnol 23: 3-4]. Las micromatrices se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se formaron imágenes de las micromatrices en un lector de fluorescencia Array-WoRx® BioChip (Applied Precision, LLC, Issaquah, Washington) usando los ajustes de filtro incorporado convencionales. El análisis de imágenes y adquisición de datos se realizaron usando el paquete de software GenePix Pro v6.1 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante de la micromatriz (Human ProtoArray® v4.0, Invitrogen, Carlsbad, CA).

50 Se identificaron sistemáticamente 92 muestras de suero diferentes de individuos normales y pacientes con diversas enfermedades frente a las micromatrices de proteoma para detectar la presencia de autoanticuerpos frente a las proteínas agrupadas (autoantígenos potenciales). Para esto, se usaron 2 lotes de micromatrices diferentes en 2 estudios secuenciales. La composición de toda la población de pacientes fue la que sigue a continuación: n.º de Lote de la Micromatriz 1 (80 muestras únicas) - 18 pacientes con Cirrosis Biliar Primaria (PBC) con respecto a 62 muestras de control que no son de PBC [13 normales, 25 de cáncer colorrectal (CRC), 22 de lupus sistémico eritematoso (SLE), 2 de síndrome de Sjögren (SjS)]. N.º de Lote de la Micromatriz 2 (12 muestras únicas) - 3 más de PBC y 9 más de controles que no son de PBC [4 normales y 5 de hepatitis autoinmunitaria (AIH)]. Los sueros normales se emparejaron por edad y género aproximados con respecto a la población base de PBC. Los sueros de AIH se usaron porque es una enfermedad hepática autoinmunitaria diferente de PBC que se sabe que está asociada

con autoanticuerpos. Los sueros de CRC se usaron porque también se sabe que algunos pacientes con cáncer tienen diversos autoanticuerpos frente a los denominados autoantígenos asociados a tumor (TAA), incluyendo un repertorio común de autoanticuerpos nucleares observados tanto en cánceres como en enfermedad autoinmunitaria [Bei, Masuelli, Palumbo, Modesti y Modesti (2008) Cancer Lett]. Los sueros archivados se obtuvieron en los almacenes de las siguientes fuentes: El colaborador de los inventores, Dr. Donald Bloch, M.D., Centro para Inmunología y Enfermedades Inflamatorias, Hospital General de Massachusetts, Profesor Asistente de Medicina, Harvard Medical School proporcionó 12 de sueros de SLE así como los sueros de SjS y PBC. Los sueros restantes de SLE y todos los sueros de AIH eran de Bioreclamation Inc. (Hicksville, NY), los sueros normales eran de ProMedDx, LLC (Norton, MA) y los sueros de CRC eran de Asterand Inc. (Detroit, MI).

#### 10 *Análisis Bioestadístico de Datos de Micromatriz*

Para identificar los biomarcadores de autoantígeno a partir de los datos de micromatriz, los procedimientos bioestadísticos usados fueron los enfoques convencionales proporcionados por el fabricante de la micromatriz en forma del paquete de software ProtoArray® Prospector v4.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando el Formador de Perfiles de Respuesta Inmune (IRP) adicional [Hudson, Pozdnyakova, Haines, Mor y Snyder (2007) Proc Natl Acad Sci U S A 104: 17494-9]. Dos de los procedimientos bioestadísticos de este paquete de software se usaron para crear dos listados de autoantígenos de PBC correspondientes como sigue a continuación:

15 Listado de Autoantígeno "Hit Calling": Para convertir los datos a formato binario, las proteínas (es decir, autoantígenos potenciales) en cada micromatriz (1 de suero/micromatriz se puntuaron como un "hit" (es decir, positivo) o no un hit (es decir, negativo). Se recurrió a los hits de autoantígeno en una base de por micromatriz usando la puntuación Z con un umbral de punto de corte de 3 desviaciones estándar por encima de la media de la micromatriz. El número de hits en los grupos de PBC y de control para cada autoantígeno se usó para determinar el porcentaje de prevalencia de cada autoantígeno. Los autoantígenos colocados en último lugar en este listado tenían que tener un porcentaje de prevalencia mayor en la población base de PBC que en la población base de control (es decir, todas las muestras que no eran de PBC).

25 Listado de Autoantígeno Estadística M.: Este enfoque usa datos de micromatrices normalizados a cuantiles y realiza un ensayo de t por parejas para cada proteína entre los dos grupos de pacientes (es decir, grupo de PBC y el grupo de control que corresponde a todos los pacientes que no tienen PBC). Este algoritmo también calcula la prevalencia del autoantígeno basándose en puntos de corte establecidos por los datos normalizados por cuantiles. Los autoantígenos colocados en último lugar en este listado tenían que tener un porcentaje de prevalencia mayor en la población base de PBC que en la población base de control (es decir, todas las muestras que no eran de PBC) y tenían que tener valores de p de Estadística M. < 0,1.

Los Lotes de Micromatriz n.º 1 y 2 se analizaron por separado. Para comprender una única lista final de autoantígenos de PBC derivados de micromatrices, se tomaron los observados como solapamiento en ambas listas de bioestadística mencionadas anteriormente para el de n.º de Lote 1 de la Micromatriz (solo). A continuación, se eliminó cualquier marcador en este listado reunido que era positivo en cualquiera de los pacientes con HAI (n.º de Lote de la Micromatriz 2), tal como se determina con el procedimiento de "Hit Calling". Por último, se dio prioridad al listado basándose en el valor de p de Estadística M., así como a la sensibilidad y especificidad del diagnóstico.

#### *Resultados:*

40 Dos de los marcadores de autoantígeno de PBC, hexoquinasa 1 (HK1) humana y Kelch-Like (KLHL12), identificados a partir de las micromatrices de proteoma y reivindicados en esta patente, se enumeran en la **Tabla I**, junto con sus valores de p de Estadística M., así como sus sensibilidades y especificidades de diagnóstico (calculadas a partir del Lote de la Micromatriz n.º 1). Los datos de la micromatriz normalizados a cuantiles (intensidad de señal del autoanticuerpo normalizada) para las 92 muestras (es decir, las 92 micromatrices) se muestran en la **Figura 16 y la Figura 17** para HK1 y KLHL12 respectivamente. En resumen (**Tabla I**), la presencia de autoanticuerpos en suero frente al autoantígeno se correlaciona fuertemente con la población base de PBC, que muestra valores de p altamente significativos ( $1 \times 10^{-10}$  y  $8 \times 10^{-5}$  para HK1 y KLHL12 respectivamente) así como sensibilidades de un 85-89 % y de un 33-40 % para HK1 y KLHL12 respectivamente, y, especificidades de un 84-90 % y de un 97-98 % para HK1 y KLHL12 respectivamente (véase la **Tabla I** para más detalles). Por definición (véase "Análisis Bioestadístico de Datos de Micromatrices" anteriormente en este Ejemplo), ninguno de los 5 sueros de Hepatitis Autoinmunitaria (HAI) era positivo para HK1 o KLHL12 (véase también la **Figura 16 y la Figura 17**; n.º de Lote de la Micromatriz 2). Los biomarcadores de autoantígeno de HK1 o KLHL12 también fueron objeto de una validación adicional como se detalla en otros Ejemplos experimentales.

55 También se debería indicar que algunos autoanticuerpos de HK1 también se observan con baja prevalencia en el lupus eritematoso sistémico (SLE) y el cáncer colorrectal (CRC) (**Figura 16**). N-03 es la única muestra de suero "normal" positiva para HK1 (**Figura 16**; barra de color rojo). N-03 es también la única muestra de suero "normal" positiva para KLHL12 (**Figura 17**; barra de color rojo). Por lo tanto, de hecho, se cree que N-03 sin embargo puede tener PBC sin diagnosticar ni informar/ni documentar (observar que se ha demostrado que algunos autoanticuerpos son anteriores a los síntomas/manifestaciones clínicos de la enfermedad autoinmunitaria, incluyendo en PBC).

**Ejemplo 2:** Validación Previa de Nuevos Autoantígenos HK1 y KLHL12 de Cirrosis Biliar Primaria (PBC) Usando un ensayo ELISA

Se debería indicar que el ensayo de ELISA que se describe en el presente documento en este Ejemplo y que se usa en muchos Ejemplos posteriores se denomina T<sup>2</sup>-ELISA, y se basa en el uso de antígenos de proteína expresados sin células etiquetados con epítipo doble. En este Ejemplo, esos antígenos son HK1 y KLHL12 y el T<sup>2</sup>-ELISA usado como una herramienta para validación previa clínica (y validación ocasional en Ejemplos posteriores) de estos nuevos autoantígenos derivados de micromatriz.

**Expresión de Autoantígeno**

Todos los Marcos de Lectura Abiertos (ORF) de HK1 y KLHL12 humanas se clonaron, usando prácticas de biología molecular convencionales y aceptadas, en un vector de plásmido compatible con la expresión de proteínas y células, que contenía el promotor de la T7 ARN polimerasa, una secuencia de Kozak (unión de ribosomas), un codón de inicio, una etiqueta de epítipo de VSV-G N-terminal (YTDIEM-NRLGK), y una etiqueta de epítipo de HSV C-terminal (QPELAPEDPED) además del inserto de ORF. Como fuente de ADN para la clonación en el vector de expresión, se adquirieron clones de secuencia verificada de longitud completa en OpenBiosystems (Huntsville, AL) [catálogo OHS1770-9381021 (UniGene Hs.370365) para HK1 y MHS1011-61211 (UniGene Hs.706793) para KLHL12]. Los vectores de expresión se verificaron para el inserto corrector del ORF usando procedimientos de digestión con EcoRI convencionales y/o secuenciación de ADN.

Los autoantígenos se produjeron a partir de los clones de plásmido mencionados anteriormente mediante expresión de proteínas sin células. Las reacciones de expresión de proteínas sin células se realizaron usando un sistema del lisado de reticulocitos de conejo acoplados por transcripción/traducción (TNT<sup>®</sup> T7 Quick para ADN de PCR; Promega, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones de expresión de autoantígeno contenían el ADN de plásmido afín mientras que las reacciones de expresión de blanco carecían solamente del ADN de plásmido. Las reacciones de expresión se detuvieron por dilución a 1/20 en TDB [BSA al 1 % (p/v) y Triton X-100 al 0,1 % (v/v) en TBS-T (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, Tween-20 al 0,05 % (v/v))].

**Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas de Etiqueta Doble (T<sup>2</sup>-ELISA) de Autoantígenos**

Para un ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas de tipo sándwich (ELISA) se usaron placas de microtitulación de poliestireno sin tratar, de fondo plano, opacas de color blanco Nunc Brand de 96 pocillos Polysorp<sup>™</sup> Microwell<sup>™</sup> (Nunc Brand de Thermo-fisher Scientific, Rochester, NY). Las placas se revistieron con 0,5 µg/ml de un anticuerpo de captura de etiqueta anti-HSV<sup>®</sup> monoclonal de ratón (EMD Biosciences, Inc., San Diego, CA) en carbonato/bicarbonato sódico a pH 9,3 durante 30 min con agitación (50 µl/pocillo). A continuación, las placas se lavaron 6x en TBS-T (pocillos llenos hasta el nivel máximo) en un Lavador de Placas Robótico ELx405 Select (BioTek, Winooski, VT). Todos los lavados de placas se realizaron de esta manera a menos que se indicara de otro modo. A continuación, las placas se bloquearon durante 30 min a 300 µl/pocillo en BSA al 1 % (p/v) en TBS-T. La solución se retiró de las placas y las reacciones de expresión sin células (reacciones de autoantígeno y blanco) mencionadas anteriormente se detuvieron (es decir, se diluyeron) se añadieron a continuación a 100 µl/pocillo y se agitaron durante 30 min. Las placas se lavaron y las muestras de suero (diluidas a 1/1.000 en BSA al 1 % (p/v) en TBS-T) se añadieron a 100 µl/pocillo y se agitaron durante 30 min. Cada muestra de suero se desarrolló frente a pocillos por triplicado de autoantígeno y pocillos por triplicado del blanco de expresión sin células. Además, se diseñó un conjunto de pocillos por triplicado de autoantígeno y un conjunto de pocillos por triplicado del blanco de expresión sin células para detección de etiqueta de epítipo de VSV-G, y por lo tanto recibieron BSA sencillo al 1 % (p/v) en TBS-T en lugar de suero diluido. Para evitar la contaminación del lavador de placas robótico con suero humano, las placas se lavaron posteriormente 4x mediante adición manual de TBS-T (pocillos llenos hasta el nivel máximo) seguido de aspiración al vacío y a continuación se lavaron 6x en el lavador de placas robótico como se ha descrito anteriormente en este Ejemplo. A continuación, los pocillos diseñados para detección de la etiqueta de epítipo de VSV-G recibieron un anticuerpo monoclonal etiquetado con peroxidasa de rábano picante (HRP) anti-VSV-G (Clone P5D4, Roche Applied Science, Indianapolis, IN) diluido a 1/20.000 en BSA al 1 %/TBS-T. Los pocillos diseñados para detección de autoanticuerpo de suero recibieron un anticuerpo secundario monoclonal etiquetado con HRP anti-[IgG humana] de ratón (reactividad cruzada mínima con inmunoglobulina de ratón; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA) diluido a 1/20.000 en BSA al 1 %/TBS-T. Las placas se agitaron durante 30 min. A continuación, las soluciones se descargaron de las placas de forma manual por inversión, seguido de golpeteo vigoroso de las placas invertidas en una toalla de papel seco para retirar el fluido residual. A continuación, las placas se lavaron en el lavador de placas robótico como se ha descrito anteriormente en este Ejemplo. La señal de quimioluminiscencia se generó mediante la adición de 50 µl/pocillo de Sustrato de Quimioluminiscencia de Pico de ELISA SuperSignal (Marca Pierce de Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Las placas se desarrollaron mediante agitación durante 15 min y a continuación se leyeron lector de placas de luminiscencia LumiCount (exposición de 1 s, PMT de 650 V, ganancia 1) (Packard/PerkinElmer Life y Analytical Sciences, Inc., Boston, MA).

**Resultados:**

Para esta validación previa de los nuevos marcadores de autoantígeno de PBC enumerados en la Tabla I, los sueros

que se seleccionaron de forma aleatoria que se detectaron como positivos o negativos para un autoantígeno dado en los análisis de micromatriz (véase el Ejemplo 1) también se analizaron aquí mediante T<sup>2</sup>-ELISA.

El cálculo de las Unidades de Autoanticuerpo a partir del T<sup>2</sup>-ELISA, en resumen, se consiguió restando el fondo de los datos y normalizando con respecto a la detección de la etiqueta de epítipo de VSV-G común para cada antígeno en cada ensayo (es decir, cada placa). De forma más específica, para cada par de suero-autoantígeno, para cada uno de los pocillos por triplicado a partir de los datos de T<sup>2</sup>-ELISA, las Unidades de Autoanticuerpo se calcularon como sigue a continuación: **[señal de autoanticuerpo de un pocillo (es decir, suero con respecto a autoantígeno)] menos [fondo medio de los triplicados (es decir, el mismo suero con respecto al promedio de los tres pocillos de expresión de blanco)]** para proporcionar Valores Restados del Fondo (BSV) por triplicado para cada par de suero-autoantígeno. Observar que un ensayo se define como una placa de ELISA de microtitulación de 96 pocillos. Para normalizar las varianzas inter-ensayo (día a día y ensayo a ensayo) para cada autoantígeno, los pocillos de cada ensayo, para cada autoantígeno uno de ese ensayo, se dedicaron únicamente para detección de la etiqueta de epítipo de VSV-G común. El Factor de Normalización de VSV-G (VNF) se calculó como sigue a continuación: **[señal media de VSV-G para pocillos por triplicado (es decir, pocillos de autoantígeno detectados con anticuerpo VSV-G)] menos [fondo medio de VSV-G para pocillos por triplicado (es decir, pocillos de expresión de blanco detectados con anticuerpo VSV-G)]**. En una base por ensayo, los BSV por triplicado para todos los pares de suero-autoantígeno se dividieron a continuación entre el VNF para ese ensayo se multiplicó por 100, proporcionando valores de Unidad de Autoanticuerpo por triplicado para cada par de suero-autoantígeno (es decir, se expresó como un porcentaje del VNF). Observar que se estableció un suelo de cero para las Unidades de Autoanticuerpo. La desviación media y estándar (barras de errores) se calcularon y se representaron en las **Figuras 1 y 2** para los nuevos autoantígenos los NK1 y KLHL12 de PBC respectivamente.

Los sueros se puntuaron "de forma analítica", como positivo o negativo en el T<sup>2</sup>-ELISA para comprobar la concordancia con las micromatrices. Para esto, se deben haber satisfecho ambos de los siguientes criterios para cada par de suero-autoantígeno para que hayan puntuado como positivos de forma analítica en el T<sup>2</sup>-ELISA: i) un valor de  $p \leq 0,05$  en un ensayo de t sin emparejar homocedástico de 1 cola en los valores de T<sup>2</sup>-ELISA sin procesar a partir de los pocillos por triplicado de la señal del autoanticuerpo (es decir, suero con respecto a autoantígeno) en comparación con el fondo (es decir, el mismo suero con respecto a los pocillos de expresión del blanco); ii) proporción señaló con respecto a fondo de autoanticuerpo  $\geq 2$ . En las **Figuras 1, y 2**, las puntuaciones de T<sup>2</sup>-ELISA y las puntuaciones de micromatriz ("Matriz") se indican como positivo (+) o negativo (-). Para HK1 (**Figura 1**), de 12 sueros seleccionados de forma aleatoria que eran positivos con los análisis de micromatriz, 10 eran positivos por ELISA para una concordancia de un 83 %. Además, para HK1 (**Figura 1**), se seleccionaron 5 sueros de forma aleatoria que eran negativos en las micromatrices, todos los cuales también eran negativos por T<sup>2</sup>-ELISA para una concordancia de un 100 %. Para KLHL12, de los 7 sueros negativos y 4 sueros positivos elegidos de forma aleatoria a partir de los análisis de micromatriz (véase el Ejemplo 1), se produjo una concordancia total de un 100 % con los resultados de T<sup>2</sup>-ELISA como se muestra en la **Figura 2**.

**Ejemplo 3:** Validación de Nuevos Autoantígenos HK1 y KLHL12 de Cirrosis Biliar Primaria (PBC) Usando un ELISA en una Nueva Población Base de Pacientes con PBC Positiva para AMA No Identificada de Forma Sistemática Anteriormente con Micromatrices

#### *Expresión de Autoantígeno*

Como en el Ejemplo 2.

#### *Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas de Etiqueta Doble (T<sup>2</sup>-ELISA) de Autoantígenos*

Como en el Ejemplo 2.

#### *Resultados:*

Una validación crítica de los marcadores recién descubiertos es realizar estudios en una nueva población base de pacientes (22 muestras de PBC), nunca antes identificadas sistemáticamente en las micromatrices de proteoma. En este Ejemplo, esto se ha realizado con ambos de los nuevos autoantígenos de PBC, HK11 y KLHL12\_ (enumerados anteriormente en la **Tabla I**).

Los nuevos sueros de PBC se obtuvieron por parte del colaborador de los inventores, Dr. Donald Bloch, M.D., Centro para Inmunología y Enfermedades Inflamatorias, Hospital General de Massachusetts, Profesor Asistente de Medicina, Harvard Medical School y los sueros normales eran de ProMedDx, LLC (Norton, MA).

El cálculo de las Unidades de Autoanticuerpo a partir del T<sup>2</sup>-ELISA, en resumen, se consiguió restando el fondo de los datos y normalizando con respecto al control positivo en cada ensayo (es decir, cada placa), mediante lo cual el control positivo se establece en 1.000 Unidades de Autoanticuerpo. De forma más específica, para cada par de suero-autoantígeno, para cada uno de los pocillos por triplicado a partir de los datos de T<sup>2</sup>-ELISA, las Unidades de Autoanticuerpo se calcularon como sigue a continuación: **[señal de autoanticuerpo de un pocillo (es decir, suero con respecto a autoantígeno)] menos [fondo medio de los triplicados (es decir, el mismo suero con respecto al promedio de los tres pocillos de expresión de blanco)]**. Esto proporciona Valores Restados del Fondo (BSV)

por triplicado para cada par de suero-autoantígeno. Observar que un ensayo se define como una placa de ELISA de microtitulación de 96 pocillos. Para normalizar las varianzas inter-ensayo (día a día y ensayo a ensayo) para cada autoantígeno, en cada ensayo se desarrolló un suero de PBC de control positivo común para HK1 y KLHL12 (seleccionado de población base de PBC de la micromatriz en el Ejemplo 1). Los datos de T<sup>2</sup>-ELISA de control positivo se procesaron de la manera mencionada anteriormente en una base por ensayo y se hizo el promedio de los BSV por triplicado para proporcionar el Factor de Normalización de Control Positivo (PCNF) para cada ensayo. En una base por ensayo, los por BSV triplicado para todos los pares de suero-autoantígeno se dividieron a continuación entre el PCNF para ese ensayo y se multiplicó por 1.000, proporcionando valores de Unidad de Autoanticuerpo por triplicado para cada par de suero-autoantígeno. De forma importante, la detección de la etiqueta de epítipo común de VSV-G (Ejemplo 2) también se usó para verificar la expresión de la autoantígeno satisfactoria y coherente; pero aquí no se usó en el cálculo de Unidades de Autoanticuerpo.

Para establecer umbrales de puntuación de diagnóstico para un autoantígeno dado, el ensayo de T<sup>2</sup>-ELISA se realizó en un grupo de 22 sueros de pacientes normales y los puntos de corte se ajustaron a continuación a 2 desviaciones estándar por encima de la media para esta población base normal, para una confianza estadística de ~95 %. El uso de este procedimiento a 2-3 desviaciones estándar es una práctica común (por ejemplo, [Liu, Wang, Li, Xu, Dai, Wang y Zhang (2009) Scand J Immunol 69: 57-63]). Sin embargo, un requisito crítico de este procedimiento de cálculo del punto de corte basado en la desviación estándar es que los datos siguen una distribución Gaussiana, aunque un ensayo de Shapiro-Wilk para normalidad determinó que éste no era el caso. Como una solución, los inventores transformaron las Unidades de Autoanticuerpo de forma log<sub>2</sub> y ajustaron el suelo a 0 (es decir, los valores no transformados ≤ 0 se dejaron como 0 sin transformación) proporcionan una distribución Gaussiana (de los valores > 0) y permitiendo que los puntos de corte se establecieran basándose en la metodología de desviación estándar mencionada anteriormente. Los valores de Unidad de Autoanticuerpos ≤ 0 se excluyeron de los cálculos del punto de corte porque la resta del fondo se usa en el cálculo de las Unidades de Autoanticuerpo, lo que significa que las muestras de pacientes que proporcionan valores ≤ 0 tendrían por definición que se puntuadas como autoanticuerpo negativo independientemente (es decir, un punto de corte no es necesario ni relevante para valores ≤ 0).

Como se observa en los datos de la **Figura 3** para HK1, usando un punto de corte de 2,0, una sensibilidad del diagnóstico de un 82 % (especificidad de un 100 %) en esta nueva población base de muestra estaría bien de acuerdo con los análisis de micromatriz realizados en la población base de la muestra original (véase la Tabla I). como se observa en los datos de la **Figura 4** para KLHL12, usando un punto de corte de 2,5, una sensibilidad del diagnóstico de un 36 % (especificidad de un 100 %) en esta nueva población base de muestra estaría bien de acuerdo con los análisis de micromatriz realizados en la población base de la muestra original (véase la **Tabla I**).

Ejemplo 4: Validación de Nuevos Autoantígenos HK11 y KLHL12 de Cirrosis Biliar Primaria (PBC) Usando un ELISA en una Nueva Población Base de Pacientes con PBC Negativa para Anticuerpo Anti-Mitocondrial (AMA) No Identificada de Forma Sistemática Anteriormente con Micromatrices

Los pacientes de los que se sospecha que tienen PBC pero con un estado negativo para anticuerpo antimitocondrial (AMA) representan aproximadamente un 5-20 % de todos los pacientes con PBC [Oertelt, Rieger y col., Hepatology 2007; 45: 659-665], y los pacientes con PBC negativa para AMA son particularmente difíciles de confirmar de forma diagnóstica basándose en el seroensayo y usando los autoantígenos Sp100 and gp210 conocidos y validados solamente da como resultado la detección de una fracción de los pacientes con PBC negativa para AMA (por ejemplo, un 17-33 % en un estudio reciente [Liu, Shi, Zhang, Zhang y Gao (2008) Liver Int 28: 233-9]), lo que muestra una necesidad de autoantígenos específicos que puedan detectar pacientes con PBC negativa para AMA.

Para someter a ensayo la capacidad de los nuevos autoantígenos, HK1 y KLHL12, de los inventores para detectar pacientes con PBC negativa para AMA, los inventores usaron 17 sueros de pacientes que eran negativos para AMA mediante inmunofluorescencia indirecta (IIF) pero con PBC confirmada con los procedimientos convencionales [Heathcote (2000) Hepatology 31: 1005-13], y mediante biopsia hepática. Los nuevos sueros de PBC negativa para AMA se obtuvieron a partir del colaborador de los inventores, Dr. Donald Bloch, M.D., Centro para Inmunología y Enfermedades Inflamatorias, Hospital General de Massachusetts, Profesor Asistente de Medicina, Harvard Medical School. Los inventores compararon la capacidad de los nuevos autoantígenos, HK1 y KLHL12, con los ensayos disponibles en el mercado para detectar estos pacientes con PBC confirmada pero con un estado negativo para AMA conocido.

#### *Expresión de Autoantígeno*

Como en el Ejemplo 2.

#### *Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas de Etiqueta Doble (T<sup>2</sup>-ELISA) de Autoantígenos*

Como en el Ejemplo 2.

#### *ELISA de PBC Comerciales Aprobados por la FDA*

Los ELISA Comerciales Aprobados por la FDA para diagnóstico de PBC también se realizaron y fueron los ensayos

de IgG/IgA para Identificación Sistemática de PBC de Quanta Lite™ M2 EP (MIT3), Quanta Lite™ sp100, Quanta Lite™ gp210 y Quanta Lite™ de INOVA Diagnostics (San Diego, CA); y se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

*Resultados:*

5 Para fines de puntuación, los cálculos de la Unidad de Autoanticuerpo y los umbrales de diagnóstico establecidos en el Ejemplo 3 se usaron de nuevo aquí para cada autoantígeno (HK1 y KLHL12).

10 Como se ilustra con los datos en la **Figura 5** para HK1, 4 de 17 sueros de PBC negativa para AMA dieron positivo en el ensayo para este autoantígeno (sensibilidad de un 24 %). Como se observa con los datos en la **Figura 6** para KLHL12, 6 de los 17 sueros de PBC negativa para AMA dieron positivo en el ensayo de diagnóstico (sensibilidad de un 35 %).

15 Los inventores también sometieron a ensayo los 17 sueros de PBC negativa para AMA mencionados anteriormente para los cuatro ensayos de PBC aprobados por la FDA disponibles en el mercado de INOVA Diagnostics, en particular, ELISA de IgG/IgA de Identificación Sistemática de PBC, Quanta Lite™ M2 EP (MIT3), Quanta Lite™ sp100, Quanta Lite™ gp210 y Quanta Lite™. Los resultados de estos ensayos, así como los resultados de T<sup>2</sup>-ELISA de los inventores con HK1 y KLHL12, se resumen en la **Tabla II**. Los ensayos de INOVA fueron incapaces de detectar 3 de los 17 pacientes (18 %). Sin embargo, de forma sorprendente, cada uno de HK1 y KLHL12 fueron capaces de detectar uno de los sueros de PBC negativa para AMA anteriormente indetectables (PB-AMN-044 y PB-AMN-263 respectivamente). El tercer paciente (PB-AMN-084) permaneció sin detectar con los autoantígenos mencionados anteriormente pero se detectó con Sp140 (véase el Ejemplo 6 para detalles). Estos resultados se resumen en la **Figura 7** como un Diagrama de Venn, que ilustra el solapamiento (o falta del mismo) entre los diversos biomarcadores. Ha visto inicial observar que los resultados del ELISA de IgG/IgA de Identificación Sistemática de PBC Quanta Lite™ no se muestran en el Diagrama de Venn (**Figura 7**), sin embargo, como se observa en la **Tabla II**, este ensayo no aumentaba la detección en comparación con los otros ensayos de INOVA. En conjunto, estos hallazgos indican que los dos nuevos autoantígenos de los inventores, HK1 y KLHL12, son diagnósticamente muy significativos. Esto sugiere que la adición de los nuevos biomarcadores de los inventores al panel existente de biomarcadores de PBC podría dar como resultado el aumento de la detección, y por lo tanto un tratamiento más temprano y mejora de los resultados de los pacientes con PBC, en particular los pacientes con PBC negativa para AMA.

**Ejemplo 5:** Evaluación de HK1 y KLHL12 en Pacientes con Tinción Inmunofluorescencia Indirecta (IIF) Atípica

30 Los inventores proponen que el número de pacientes con PBC puede ser más elevado de lo que se sospechaba anteriormente, debido a la dificultad extrema de diseñar un diagnóstico de PBC concluyente en ausencia de tinción definitiva de AMA o el propio patrón de tinción de autoanticuerpo antinuclear (ANA) como se determina mediante inmunofluorescencia indirecta (IIF). Para someter a ensayo esta teoría, los inventores examinaron sueros de pacientes sin diagnóstico con patrones de tinción de IIF de membrana citoplasmática o nuclear. Estos nuevos sueros de paciente se obtuvieron a partir del colaborador de los inventores, Dr. Donald Bloch, M.D., Centro para Inmunología y Enfermedades Inflamatorias, Hospital General de Massachusetts, Profesor Asistente de Medicina, Harvard Medical School.

*Expresión de Autoantígeno*

Como en el Ejemplo 2.

40 *Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas de Etiqueta Doble (T<sup>2</sup>-ELISA) de Autoantígenos*

Como en el Ejemplo 2.

*ELISA de M2 EP (MIT3) Quanta Lite™*

El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (INOVA Diagnostics, San Diego, CA).

*Resultados:*

45 Los inventores realizaron el Ensayo de Quanta Lite™ en HK1, KLHL12 y el de M2 EP (MIT3) (INOVA Diagnostics, San Diego, CA) en 20 pacientes, cuyos resultados se muestran en la **Figura 8**. Las muestras de suero con los prefijos "Cito" o "NM" son de pacientes con tinción de IIF difusa de membrana citoplasmática o nuclear, respectivamente. El cálculo de las Unidades de Autoanticuerpo para el T<sup>2</sup>-ELISA tal como se realiza en HK1 y KLHL12 se realizó como en el Ejemplo 2. La puntuación para el ensayo de T<sup>2</sup>-ELISA se realizó de acuerdo con el procedimiento "analítico" que se describe en el Ejemplo 2 (observar que cualquier muestra de suero con un gráfico de barras en la **Figura 8** es positiva). Para evitar efectos de escala, los datos en gráficos para cada antígeno en la **Figura 8** se normalizan como un porcentaje de los pacientes que tienen las unidades máximas de autoanticuerpo para ese antígeno (ese paciente se marca con una flecha de color azul para cada antígeno). Los inventores establecieron el eje Y para punto de corte de MIT3 de INOVA de 25 unidades (basándose en el control positivo bajo; el punto de corte se

determinó de acuerdo con las instrucciones del fabricante), que corresponde a un 17 %, de modo que todas las barras representan resultados positivos.

5 Un paciente se detecta con los tres marcadores. El nuevo autoantígeno KLHL12 detectados pacientes con membrana nuclear que otros marcadores no detectan. Por último, MIT3 detecta una membrana nuclear y varios pacientes citoplasmáticos que otros marcadores no detectan. Estos resultados sugieren fuertemente que la detección de los antígenos de HK1, KLHL12 y MIT3 puede ser útil para revelar un gran número de pacientes sin diagnosticar previamente que padecen PBC, pero con una tinción de IIF atípica.

**Ejemplo 6:** Aumento de la Sensibilidad del Diagnóstico con ELISA para Cirrosis Biliar Primaria (PBC) mediante Detección de Sp140

10 Algunos anticuerpos antinucleares que reaccionan con 5-20 aplicaciones puntuales nucleares se detectan en un 20-30 % de pacientes con cirrosis biliar primaria (PBC). El patrón de tinción de "aplicación puntual nuclear múltiple" (MND) producido por estos anticuerpos se dirige frente a componentes del cuerpo nuclear de proteínas de leucemia promielocítica (PML NB), uno de los cuales se identificó recientemente como Sp140. Se ha informado que Sp140 está presente en un 13 % de pacientes con PBC, con una proporción más elevada de pacientes con PBC negativa para AMA en comparación con positiva para AMA (53 % con respecto a 8 %) [Granito, A, Yang, W. y col., 2009, Am J Gastroenterol, In Press]. Por lo tanto, los inventores sometieron a ensayo Sp140 en su T<sup>2</sup>-ELISA.

20 Los sueros de pacientes con PBC se obtuvieron a partir del colaborador de los inventores, Dr. Donald Bloch, M.D., Centro para Inmunología y Enfermedades Inflamatorias, Hospital General de Massachusetts, Profesor Asistente de Medicina, Harvard Medical School. El estado de Sp140 se determinó inicialmente mediante IIF en células que expresan Sp140 con respecto a células negativas.

*Expresión de Autoantígeno*

Como en el Ejemplo 2.

*Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas de Etiqueta Doble (T<sup>2</sup>-ELISA) de Autoantígenos*

Como en el Ejemplo 2.

25 ELISA de Sp100 QUANTA Lite™

El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (INOVA Diagnostics, San Diego, CA).

*Resultados:*

30 Los cálculos de Unidad de Autoanticuerpo de T<sup>2</sup>-ELISA y la puntuación "analítica" se realizaron como en el Ejemplo 2. La puntuación para el ELISA de Sp100 de INOVA Diagnostics se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados se encuentran en la Tabla III. De forma notable, aunque Sp100 era incapaz de ser detectado en los pacientes PB-AMP-020 o PB-AMN-084 con PBC (sombra de color naranja) con cualquiera del ensayo de T<sup>2</sup>-ELISA de los inventores o el ensayo de INOVA, la plataforma de T<sup>2</sup>-ELISA era capaz de detectar estos pacientes con PBC usando el autoantígeno Sp140. La detección de PB-AMN-084 es la más notable, dado que este paciente no se detectó con ninguno de los siguientes: los procedimientos de inmunofluorescencia indirecta (IIF) de Sp140 (no se muestra), cualquiera de los ensayos de ELISA de PBC disponibles de INOVA, o cualquiera de los nuevos autoantígenos HK1 y KLHL12 como se determina con T<sup>2</sup>-ELISA (véase anteriormente en el Ejemplo 4 y en la Tabla II para estos resultados de ELISA).

Entonces, en conjunto, HK1, KLHL12 y Sp140 pueden servir como un panel de autoantígenos de diagnóstico potente que permiten el diagnóstico rápido y preciso de pacientes con PBC no detectados anteriormente.

40 Este Ejemplo también demuestra otro resultado importante, es decir, con respecto a Sp100, la plataforma de T<sup>2</sup>-ELISA de los inventores tiene una concordancia básicamente de un 100 % con el ELISA de Sp100 aprobado por la FDA de INOVA. Los únicos resultados discordantes fueron 2 casos en los que el T<sup>2</sup>-ELISA proporciona un resultado negativo y el ensayo de INOVA un resultado equívoco, es decir, demasiado cercano al punto de corte designado de INOVA para que fuera concluyente (de acuerdo con los procedimientos de puntuación del fabricante).

45 **Ejemplo 7:** Detección de Autoanticuerpos con ELISA Colorimétrico Con Respecto A Quimioluminiscente Frente a los Nuevos Autoantígenos HK1 y KLHL12 de Cirrosis Biliar Primaria (PBC) Usando Suero de Paciente con PBC

50 Los experimentos de ELISA que exploran la unión entre a autoantígenos y autoanticuerpos normalmente usan una de dos estrategias de detección. Por lo general se acepta que la quimioluminiscencia les más sensible y tiene un rango dinámico más amplio, mientras que por lo general se acepta que la colorimetría es más estable y coherente. La finalidad de estos experimentos era realizar exactamente el mismo experimento dos veces a continuación desarrollarlo en paralelo, una vez mediante detección colorimétrica, y una vez mediante detección quimioluminiscente.

*Expresión de Autoantígeno y T<sup>2</sup>-ELISA*

Realizado como en el Ejemplo 2 excepto para la detección de ELISA colorimétrico, se usaron los siguientes reactivos de la plataforma de ELISA QUANTA Lite™ de INOVA Diagnostics (San Diego, CA): Diluyente de Muestra de HRP, Concentrado de Lavado de HRP, Conjugado de IgG de HRP, Cromógeno de TMB, Solución de Parada de HRP. Se siguieron las instrucciones de acuerdo con el fabricante. La puntuación de diagnóstico para el ELISA quimioluminiscente fue la que ya se ha determinado en el Ejemplo 4 para los mismos sueros.

*Resultados:*

Los resultados de ELISA de HK1 en sueros de pacientes con PBC se muestran en la **Figura 9A** y KLHL12 en la **Figura 9B**, lo que demuestra detección tanto colorimétrica como quimioluminiscente. Los resultados del ensayo colorimétrico se representan como señal menos fondo, con el fondo siendo el mismo suero desarrollado con respecto a un blanco de expresión (sin autoantígeno expresado). La puntuación de ELISA de quimioluminiscencia se enumera bajo el Eje X como "+" (positivo) o "-" (negativo). Observar que las puntuaciones para el ELISA quimioluminiscente fueron las que ya se han determinado en el Ejemplo 4 para los mismos sueros (con sueros de PB-AMN-044 y PB-AMN-263, resaltados en color verde en las **Figuras 9A y B**, siendo los puntuados anteriormente como negativo para todos los ensayos de ELISA de PBC disponibles de INOVA Diagnostics pero positivos para HK1 y KLHL12 respectivamente). Estos resultados demuestran claramente una concordancia entre los procedimientos de lectura de ELISA quimioluminiscente y colorimétrico.

**Ejemplo 8:** Viabilidad del Diagnóstico de Punto de Atención - Detección de Transferencia Puntual Colorimétrica de Autoanticuerpos con Respecto al Nuevo Autoantígeno HK1 de Cirrosis Biliar Primaria (PBC) Usando Suero de Paciente con PBC

La finalidad de este ejemplo es mostrar el estudio preliminar de eficacia para uso de autoantígenos en un ensayo de diagnóstico basado en autoanticuerpo de punto de atención (POC) para enfermedad autoinmunitaria (es decir, un ensayo que se realiza rápida y fácilmente en la consulta médica, por ejemplo, por un internista, un facultativo general o reumatólogo).

Un formato común de un inmunoensayo en fase sólida para diagnóstico del punto de atención (POC) es el procedimiento inmunocromatográfico basado en flujo lateral, realizaron una matriz de membrana sólida porosa, tal como nitrocelulosa. Por ejemplo, se permite que una muestra de sangre, así como un reactivo detector etiquetado de forma colorimétrica (normalmente una etiqueta de oro coloidal) fluyan mediante acción capilar a través de la longitud de una tira de nitrocelulosa, poniendo en contacto posteriormente la zona de ensayo en la que, por ejemplo, un antígeno, anticuerpo de captura u otro agente de captura se habían inmovilizado anteriormente (es decir, separado). Un resultado positivo se visualiza como una raya coloreada en la zona de ensayo.

La forma reconocida más omnipresente de un ensayo de este tipo es el ensayo de embarazo "en casa", sin embargo, son posibles diversos formatos para detección rápidamente de anticuerpos en sangre humana, por ejemplo, para detección de infección con patógenos [Biagini, Sammons, Smith, MacKenzie, Striley, Snawder, Robertson y Quinn (2006) Clin Vaccine Immunol 13: 541-6; Laderman, Whitworth, Dumauval, Jones, Hudak, Hogrefe, Carney y Groen (2008) Clin Vaccine Immunol 15: 159-63].

Para imitar este tipo de dispositivo y mostrar la viabilidad con el nuevo autoantígeno HK1 de PBC informado en esta patente, se realiza un ensayo de transferencia puntual. En este ensayo, la autoantígeno se inmoviliza en una membrana de nitrocelulosa que a continuación se detecta con suero de paciente. La detección de la autoanticuerpos nido se consigue con un anticuerpo detector de IgG anti-humana etiquetado con oro coloidal. Los detalles del procedimiento y los resultados son los que siguen a continuación:

*Transferencia Puntual Colorimétrica de Autoantígeno*

La proteína Hexoquinasa 1 humana purificada recombinante (HK-1, Alpha Diagnostic, International, San Antonio, TX) se diluyó a 200 ng/μl en TBS (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM). La IgG humana se diluyó a 250 ng/μl en PBS (fosfato sódico 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM).

Se cortó nitrocelulosa (HiFlow Plus, Millipore Corporation, Bedford, MA) para formar tiras de 0,5 cm x 3 cm. De forma individual, se hizo una aplicación puntual de 1 μl de cada uno de TBS, HK1 e IgG humana en la nitrocelulosa y se permitió que se secara cuidadosamente por incubación durante 1 h a 37 °C. A continuación, las tiras se trataron en tampón de bloqueo [BSA al 1 % (p/v) en TBS-T (TBS con Tween-20 al 0,05 % en v/v)] durante 30 min a temperatura ambiente (TA). El bloque se aspiró al vacío. El suero del paciente se diluyó a 1:100 en Bloque y a continuación se incubó con tiras de nitrocelulosa durante 30 min a TA. El suero se aspiró y las tiras se lavaron con 1,5 ml de TBS-T: 4 x 5 min cada una. Las tiras se detectaron con anticuerpo secundario conjugado con oro coloidal [anticuerpo de IgG Anti-Humana (H+L), etiquetado con oro (40 nm), KPL, Gaithersburg, MD] diluido a 1:10 en agitación de Bloque a TA durante 3 horas.

*Resultados:*

Los inmunoensayos de flujo lateral ofrecen un formato sencillo, preciso con informe de resultados rápidos y fácil de usar y por lo tanto son una plataforma de diagnóstico de punto de atención (POC) popular. Los dispositivos basados en flujo lateral usan principios de inmunocromatografía para someter a ensayo fluidos biológicos tales como sangre de diversos analitos en cuestión de minutos, en condiciones de "campo" sin instrumentación ni experiencia especiales. Para someterá ensayo la viabilidad de un ensayo de POC de flujo lateral colorimétrico de autoantígenos de PBC, los inventores realizaron un experimento modelo de transferencia puntual.

La HK1 humana purificada recombinante se aplicó puntualmente sobre nitrocelulosa, así como tampón de vehículo (control negativo) e IgG humana (control positivo). Se permitió que los sueros diluidos (100 1) de un paciente con PBC y paciente normal se unieran y se lavaron antes de añadir de IgG anti-humana etiquetada con oro coloidal. Los resultados se muestran en la **Figura 10**. Después de 1 h 20 min, todos los puntos de IgG (controles positivos) se habían vuelto de color rosa. El punto de HK1 se volvió de color rosa con dilución a 1:100 de suero de paciente con PBC pero era negativo (sin color) con suero normal. Los puntos de control negativo (solamente tampón de vehículo) permanecieron incoloros.

**Ejemplo 9:** Un Ensayo Heterogéneo en Fase Sólida Basado en Etiqueta de Epítipo Doble (T<sup>2</sup>-ELISA) como Herramienta para Detección de Interacciones de Proteínas

Los inventores han desarrollado un nuevo ensayo heterogéneo en fase sólida normalizado internamente y de alto rendimiento que se basa en proteínas diana expresadas sin células (*in vitro*) etiquetadas con epítipo doble capturadas en una superficie. El ensayo puede detectar la unión de "sondas" (por ejemplo, fármacos, oligonucleótidos o anticuerpos) a las proteínas diana expresadas sin células inmovilizadas en la superficie, mientras que es capaz de normalizar la cantidad de proteína diana en la misma superficie. Aunque el Ejemplo que se muestra en este documento se refiere a la detección de la unión del autoanticuerpo a partir de suero humano a autoantígenos expresados sin células como las proteínas diana, la metodología es aplicable en términos generales. Además, aunque el formato de ensayo usado en este Ejemplo es un formato de ELISA basado en placa de micropocillos (microtitulación), son posibles diversos formatos de ensayo.

Una realización del nuevo ensayo de los inventores, que llamaremos el procedimiento de T<sup>2</sup>-ELISA, comprende la captura de un autoantígeno (proteína diana) en el pocillos de la placa de microtitulación con una etiqueta de epítipo (etiqueta de captura), seguido de la lectura de la señal del autoanticuerpo (sonda) en el mismo pocillo, a la vez que se usa la otra etiqueta (etiqueta de detección) para normalizar la cantidad de proteína expresada en pocillos separados. Con el fin de comparar el ensayo de T<sup>2</sup>-ELISA de los inventores con un ensayo de ELISA semicuantitativo aprobado por la FDA, disponible en el mercado para la detección de anticuerpos de IgG anti-sp100 en suero humano (QUANTA Lite™ sp100; INOVA Diagnostics, San Diego, CA) los inventores configuraron el siguiente experimento: en resumen, los autoantígenos se expresan sin células, se purifican en línea con el ensayo basado en placa de microtitulación (es decir, capturado en la superficie del pocillo) y se identifican sistemáticamente frente a sueros de pacientes para unión de autoanticuerpo usando un formato de ELISA de sándwich tradicional. Los anticuerpos detectores etiquetados con enzimas (cada uno con un sustrato quimioluminiscente diferente) se añaden en serie, tras lo cual se añaden dos sustratos quimioluminiscentes a los pocillos apropiados de uno en uno con el fin de leer tanto la unión al autoanticuerpo así como la etiqueta de detección (señal de normalización).

#### *Expresión de Autoantígeno*

Se clonó todo el Marco de Lectura Abierto (ORF) del supuesto autoantígeno (en este caso Sp100 humano), usando prácticas de biología molecular convencionales y aceptadas, en un vector de plásmido compatible con la expresión de proteínas sin células, que contiene el promotor de la T7 ARN polimerasa, una secuencia Kozak (de unión al ribosoma), un codón de inicio, una etiqueta de epítipo de VSV-G N-terminal (YTDIEMNRLGK), y una etiqueta de epítipo de HSV C-terminal (QPELAPEDPED) además del ORF de inserción. Como fuente de ADN para la clonación en el vector de expresión, los clones de secuencia verificada de longitud completa se adquirieron en Open-Biosystems (Huntsville, AL). Los vectores de expresión se verificaron para la inserción correcta del ORF usando procedimientos convencionales de digestión con EcoRI.

Los autoantígenos se produjeron a partir de los clones de plásmidos mencionados anteriormente mediante expresión de proteínas sin células. Las reacciones de expresión de proteínas sin células se realizaron usando un sistema de lisado de reticulocitos de conejo acoplado al transcripción/traducción (TNT<sup>®</sup> T7 Quick para ADN de PCR; Promega, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante: las reacciones de expresión de autoantígeno contenían el ADN de plásmido afín mientras las reacciones de expresión de blanco carecían solamente del ADN de plásmido. Las reacciones de expresión se detuvieron por dilución a 1/20 en TDB [BSA al 1 % (p/v) y Triton X-100 al 0,1 % (v/v) en TBS-T (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, Tween-20 al 0,05 % (v/v))].

#### *Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) de Autoantígenos*

Para un ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas de tipo sándwich (ELISA) se usaron placas de microtitulación de poliestireno sin tratar, de fondo plano, opacas de color blanco Nunc Brand de 96 pocillos Polysorp™ Microwell™ (Marca Nunc de Thermo-Fisher Scientific; Rochester, NY). Las placas se revistieron con 0,5 µg/ml de un anticuerpo de captura de etiqueta anti-HSV<sup>®</sup> monoclonal de ratón (EMD Biosciences, Inc., San Diego, CA) en

carbonato/bicarbonato sódico a pH 9,3 durante 30 min con agitación (50 µl/pocillo). Todo el lavado de las placas consistía en la adición manual de TBS-T (pocillos llenos hasta el nivel máximo, es decir, 300 µl) seguido de aspiración al vacío, repetido 4x. Todos los lavados de placas se realizaron de esta manera a menos que se indicara de otro modo. A continuación, las placas se bloquearon durante 30 min a 300 µl/pocillo en BSA al 1 % (p/v) en TBS-T. La solución se retiró de las placas y las reacciones de expresión sin células mencionadas anteriormente se detuvieron (es decir, se diluyeron) (reacciones de autoantígeno y blanco) se añadieron a continuación a 100 µl/pocillo y se agitaron durante 30 min. Las placas se lavaron y las muestras de suero (diluidas a 1/1.000 en BSA al 1 % (p/v) en TBS-T) se añadieron a 100 µl/pocillo y se agitaron durante 30 min. Cada muestra de suero se desarrolló frente a pocillos de autoantígeno por duplicado y los pocillos por duplicado el blanco de expresión sin células con un conjunto adicional de pocillos por duplicado del blanco de expresión sin células diseñado para detección de etiqueta de epítipo de VSV-G [que recibe de este modo BSA sencillo al 1 % (p/v) en TBS-T en lugar de suero diluido]. A continuación, los pocillos diseñados para detección de la etiqueta de epítipo de VSV-G recibieron un anticuerpo monoclonal etiquetado con peroxidasa de rábano picante (HRP) anti-VSV-G, mientras que los potrillos diseñados para detección de autoanticuerpos de suero recibieron un anticuerpo secundario monoclonal etiquetado con HRP anti-[IgG humana] de ratón. Las placas se lavaron posteriormente 4x mediante adición manual de TBS-T (pocillos llenos hasta el nivel máximo) seguido de aspiración al vacío como se ha descrito anteriormente en este Ejemplo. A continuación, los pocillos diseñados para detección de la etiqueta de epítipo de VSV-G recibieron un anticuerpo monoclonal etiquetado con peroxidasa de rábano picante (HRP) anti-VSV-G (Clon P5D4, Roche Applied Science, Indianapolis, IN) diluido a 1/20.000 en BSA al 1 %/TBS-T. Los pocillos diseñados para detección de autoanticuerpo de suero recibieron un anticuerpo secundario monoclonal etiquetado con HRP anti-[IgG humana] de ratón (reactividad cruzada mínima con inmunoglobulina de ratón; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA) diluido a 1/20.000 en BSA al 1 %/TBS-T. Las placas se agitaron durante 30 min. A continuación, las soluciones se descargaron de las placas de forma manual por inversión, seguido de golpeteo vigoroso de las placas invertidas en una toalla de papel seco para retirar el fluido residual. A continuación, las placas se lavaron como se ha descrito anteriormente en este Ejemplo. La señal de quimioluminiscencia se generó mediante la adición de 50 µl/pocillo de Sustrato de Quimioluminiscencia de Pico de ELISA SuperSignal (Marca Pierce de Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Las placas se desarrollaron mediante agitación durante 15 min y a continuación se leyeron lector de placas de luminiscencia LumiCount (exposición de 1 s, PMT de 650 V, ganancia 1) (Packard/PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc., Boston, MA).

#### *ELISA de sp100 QUANTA Lite™*

El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (INOVA Diagnostics, San Diego, CA).

#### *Resultados:*

Los inventores compararon su T<sup>2</sup>-ELISA con respecto a ELISA comercial para concordancia de ensayo (**Figura 11**). Esto se realizó sometiendo al ensayo 35 sueros de cirrosis biliar primaria (PBC) para autoanticuerpos frente a la autoantígeno Sp100 conocido. El ELISA comercial (INOVA Diagnostics, San Diego, CA) es un ELISA colorimétrico aprobado por la FDA que consiste en autoantígeno inmovilizado en la superficie de la placa y se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos se muestran en la **Figura 11** usando un subconjunto de la población base de PBC. El suero de control positivo convencional de INOVA usado para calcular "Unidades" se desarrolló en ambos ensayos para convertir las señales de cada ensayo a la misma escala (Unidades/µl de Suero Puro). Ambos ensayos se puntuaron usando la metodología de INOVA, es decir, positivo cuando las unidades > 25; que es el valor al que se ajusta el suero de control positivo convencional "Bajo Positivo". Como indica la **Figura 11**, en términos de puntuación de sueros positivos o negativos, existe una concordancia perfecta. Sin embargo, el ensayo INOVA se satura muy rápidamente, aunque el T<sup>2</sup>-ELISA presenta al menos un rango dinámico más amplio de 5 veces.

**Ejemplo 10:** Comparación de T<sup>2</sup>-ELISA con un ELISA Comercial Convencional para Detección de Autoanticuerpo Asociado a Tumor p53 a Partir de Sueros de Cáncer Para Evaluar la Concordancia

#### *Expresión de Autoantígeno para T<sup>2</sup>-ELISA*

Se clonó todo el Marco de Lectura Abierto (ORF) de p53 humano usando prácticas de biología molecular convencionales y aceptadas, en un vector de plásmido compatible con la expresión de proteínas sin células, que contiene el promotor de la T7 ARN polimerasa, una secuencia Kozak (de unión al ribosoma), y HSV C-terminal (QPELAPEDPED) y etiquetas de epítipo de His 6X, además del inserto de ORF. Los vectores de expresión se verificaron para la inserción correcta del ORF usando secuenciación de ADN.

El autoantígeno p53 se produjo a partir del clon de plásmidos mencionado anteriormente mediante expresión de proteínas sin células. Las reacciones de expresión de proteínas sin células se realizaron usando un sistema de lisado de reticulocitos de conejo acoplado al transcripción/traducción (TNT<sup>®</sup> T7 Quick para ADN de PCR; Promega, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante: las reacciones de expresión de autoantígeno contenían el ADN de plásmido afín mientras las reacciones de expresión de blanco carecían solamente del ADN de plásmido. Las reacciones de expresión se detuvieron por dilución a 1/20 en TDB [BSA al 1 % (p/v) y Triton X-100 al 0,1 % (v/v) en TBS-T (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, Tween-20 al 0,05 % (v/v))].

*Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (T<sup>2</sup>-ELISA) de Autoantígenos*

Los sueros (ProMedDx, Norton, MA) de cuatro pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal (CRC) de estadios variables (que variaban del Estadio I al Estadio IV de AJCC/UICC) y de 7 individuos sin enfermedad se identificaron sistemáticamente por duplicado para autoanticuerpos frente a la autoantígeno de tumor p53 usando un ELISA comercial (EMD Biosciences, Inc., San Diego, CA) formado p53 expresado celular humano recombinante y el T<sup>2</sup>-ELISA. Para el ELISA comercial, los sueros, aclarados previamente con una centrifugación de 5 minutos a 16.000 x g en una microcentrifugadora a 4 °C, se diluyeron a 1:100 y se desarrollaron por duplicado siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante y descritas en la bibliografía [Oshikawa y Sugiyama (2000) Respir Med 94: 1085-91]. Un suero de control negativo validado (proporcionado por el fabricante) también se desarrolló por duplicado y se usó para determinar el fondo del ensayo. Las lecturas de absorbancia a 450 nm para cada pocillo se recogieron en un espectrofotómetro de microplacas SpectraMax Plus384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Para identificación sistemática de sueros con el T<sup>2</sup>-ELISA, se usó el siguiente protocolo. Para un ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas de tipo sándwich (ELISA) se usaron placas de microtitulación de poliestireno sin tratar, de fondo plano, opacas de color blanco Nunc Brand de 96 pocillos Polysorp™ Microwell™ (Nunc Brand de Thermo-fisher Scientific, Rochester, NY). Las placas se revistieron con 0,5 µg/ml de un anticuerpo de captura de etiqueta anti-HSV<sup>®</sup> monoclonal de ratón (EMD Biosciences, Inc., San Diego, CA) en carbonato/bicarbonato sódico a pH 9,3 durante 30 min con agitación (50 µl/pocillo). A continuación, las placas se lavaron de forma manual 4x en 300 µl de TBS-T usando una pipeta multicanal para añadir el tampón de lavado e inversión de las placas, seguido de golpeteo vigoroso de las placas invertidas en una toalla de papel seco para retirar el tampón de lavado y el fluido residual. El bloqueo se realizó durante 30 min con 300 µl/pocillo en BSA al 1 % (p/v) en TBS-T. La solución se retiró de las placas tal como se ha descrito y a continuación se añadieron las reacciones de expresión sin células paradas (es decir, diluidas) mencionadas anteriormente (reacciones de autoantígeno y blanco) a 100 µl/pocillo y se agitaron durante 30 min. Las placas se lavaron como anteriormente y las muestras de suero (aclaradas previamente con una centrifugación de 5 minutos a 16.000 x g en una microcentrifugadora a 4 °C) se diluyeron a 1/2.000 en BSA al 1 % (p/v) en TBS-T. Un volumen de 100 µl de suero/pocillo se añadió y que las placas se agitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Cada muestra de suero se desarrolló con respecto a pocillos por duplicado en cada una de las dos placas separadas, una que contenía el autoantígeno expresado sin células (reacción de expresión menos molde de ADN). Después de la incubación del suero, el suero se retiró por aspiración al vacío y las placas se lavaron 4x con TBS-T. Para la detección de la autoanticuerpo de suero, se añadieron a cada pocillo 100 µl de un anticuerpo secundario monoclonal etiquetado con HRP anti-[IgG humana] de ratón (reactividad cruzada mínima con inmunoglobulina de ratón; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA) diluido a 1/20.000 en BSA al 1 %/TBS-T. Las placas se agitaron durante 30 min a temperatura ambiente seguido de lavado 4x en 300 µl de TBS-T como se ha descrito anteriormente. La señal de quimioluminiscencia se generó mediante la adición de 50 µl/pocillo de de Sustrato de Quimioluminiscencia SuperSignal ELISA FEMTO (Marca Pierce de Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Las placas se desarrollaron mediante agitación durante 15 segundos a temperatura ambiente y a continuación se leyeron lector de placas de luminiscencia LumiCount (exposición de 1 s, PMT de 693 V, ganancia 1) (Packard/PerkinElmer Life y Analytical Sciences, Inc., Boston, MA).

*Resultados:*

Para someter a ensayo la concordancia del T<sup>2</sup>-ELISA de los inventores con el ELISA comercial para detectar autoanticuerpos frente a p53, un autoantígeno tumoral conocido, 34 sueros de pacientes con CRC (**Figura 12**, 1-34) y 7 sueros de individuos "normales", sin enfermedad [**Figura 12**, N1-N7 (resaltados en la caja de color verde)] se sometieron a ensayo por duplicado en cada uno de los dos ensayos. Después de la realización de cada ELISA, en primer lugar se calcularon los valores de la señal menos el fondo para cada suero. Para el ELISA comercial, el fondo se calculó como el promedio de los valores sin procesar de cada uno de los dos pocillos detectados con un suero negativo validado proporcionado por el fabricante. Este valor de fondo se prestó a continuación de los valores sin procesar de cada uno de los pocillos de ensayos detectados con cualquiera de sueros de CRC o "normales", proporcionando valores por duplicado de la señal menos el fondo para cada suero. Observar que se estableció un suelo de cero para estos valores de señal menos fondo (es decir, cualquier valor negativo se ajustó a cero). A continuación, se hizo un promedio de los valores por duplicado de señal menos fondo para cada suero proporcionando un solo valor, promedio, de señal menos fondo. Para el T<sup>2</sup>-ELISA, el fondo se determinó como el promedio de los pocillos duplicados para cada realización de suero frente al blanco de expresión sin células (menos reacción de molde de ADN). Este valor de fondo se restó a continuación de forma independiente a partir de cada uno de los valores por duplicado sin procesar para la misma realización de suero frente a autoantígeno expresado sin células (p53) proporcionando dos valores de señal menos fondo para cada suero. Al igual que el análisis de los datos ELISA comercial, de nuevo se estableció un suelo de cero para los valores de señal menos fondo. A continuación, se hizo un promedio de los valores duplicados de señal menos fondo para cada suero proporcionando un solo valor, promedio, de señal menos fondo para cada suero. A continuación, tanto para el ELISA comercial como para el T<sup>2</sup>-ELISA, los sueros se puntuaron de forma sencilla como analíticamente positivos o negativos (la **Figura 12** muestra solamente los sueros puntuados como analíticamente positivos) para comprobar la concordancia entre los dos ensayos. Para esto, ambos de los siguientes criterios se deben haber satisfecho para cada par de suero-autoantígeno para que ese par haya puntuado como analíticamente positivo en el ELISA: i) un valor de  $p \leq 0,05$  en un ensayo de t sin emparejar homocedástico de 1 cola en los valores de ELISA sin procesar a partir de los pocillos duplicados de la señal de autoanticuerpo (suero con respecto a autoantígeno) en comparación con valores a partir

de los pocillos duplicados de la señal de fondo (mismo suero con respecto a pocillos de expresión de blanco); ii) proporción de señaló con respecto a fondo de anticuerpo  $\geq 2$ . Los pares de suero-autoantígeno que no pasan estos criterios se ajustan a 0. Por último, para cada ensayo independientemente, los valores promedio de señal menos fondo de los sueros puntuados como analíticamente positivos se normalizaron con respecto al suero con el valor más elevado en el mismo ensayo (CRC 12 para el ELISA comercial y CRC19 para el T<sup>2</sup>-ELISA), que se estableció en un 100 %. Estos valores normalizados se representaron a continuación con barras de error que representan desviaciones estándar (**Figura 12**). Como se puede observar en la **Figura 12**, todos los sueros que puntuaron positivo para autoanticuerpos p53 en el ELISA comercial también puntuaron positivos (con una fuerza de señal relativa aproximadamente igual, también) en el T<sup>2</sup>-ELISA. Además, un suero de CRC adicional (suero 18), pero ningún suero normal adicional, tuvo ligeramente positivo con el T<sup>2</sup>-ELISA y negativo con el ELISA comercial. En conjunto, los datos sugieren que el T<sup>2</sup>-ELISA es al menos tan sensible como el ELISA comercial, y quizá puede ser incluso ligeramente más sensible como se indica con la capacidad para identificar una muestra de CRC adicional. Ningún ensayo detectó una señal de autoanticuerpo en ninguno de los sueros normales, lo que sugiere una concordancia muy buena con respecto a la especificidad, también.

**Ejemplo 11:** Una Ensayo Heterogéneo en Fase Sólida Basado en Etiqueta de Epítipo Doble e Indicador Doble como una Herramienta para Detectar Interacciones con Proteínas

El T<sup>2</sup>-ELISA con doble etiqueta descrito en el Ejemplo 2 usa un sistema de un solo indicador para detección de autoanticuerpo y normalización de proteína diana. Mientras que el Ejemplo 2 demuestra el uso de pocillos separados para lectura de sonda (autoanticuerpos en ese caso) y lectura de etiqueta de epítipo, este Ejemplo ilustra la capacidad del ensayo para detectar la unión de "sondas" (por ejemplo, fármacos, oligonucleótidos o anticuerpos) a las proteínas diana expresadas sin células inmovilizadas en superficie a la vez que es capaz de normalizar la cantidad de proteína diana en la misma superficie (es decir, mismo pocillo), usando un sistema de indicador doble. Aunque el Ejemplo mostrado aquí se refiere a la detección de unión de autoanticuerpo a partir de suero humano a autoantígenos expresados sin células como las proteínas diana, la metodología se puede aplicar ampliamente. Además, aunque el formato de ensayo usado en este Ejemplo es un formato de ELISA basado en placas de micropocillos (microtitulación), son posibles diversos formatos de ensayo.

Para mostrar que es posible capturar un autoantígeno (proteína diana) en el pocillo de la placa de microtitulación con una etiqueta de epítipo (etiqueta de captura) y normalizar con la otra (etiqueta de detección), a la vez que todavía se lee la señal del autoanticuerpo (sonda) en el mismo pocillo, los inventores realizaron el ensayo de T<sup>2</sup>-ELISA como se describe en el Ejemplo 2, con las siguientes excepciones: después de expresión sin células y captura de antígeno, y la adición secuencial de anticuerpos etiquetados con enzima, también se añadieron dos sustratos quimioluminiscentes diferentes de forma secuencial, permitiendo de este modo que tanto las señales de unión de autoanticuerpo como las señales de la etiqueta de detección (normalización) se leyeran de forma secuencial dentro del mismo pocillo.

Además demostrar que la detección doble dentro del mismo pocillo es posible, los inventores compararon directamente la detección del pocillo doble con respecto a la detección de un solo pocillo en una diversidad de autoantígenos con diversos sueros de pacientes, para demostrar las ventajas potenciales de la normalización por pocillo, es decir, mediante la normalización de la posible expresión de proteínas o variaciones de captura.

#### *Expresión de Autoantígeno*

Realizado como en el Ejemplo 2, con la excepción de Rap55, que se expresó a partir del producto de PCR purificado en columna. Rap55 se amplificó por PCR a partir de ADNc usando prácticas convencionales y aceptadas de biología molecular. Se diseñaron cebadores para que proporcionaran un producto de PCR compatible con expresión de proteínas sin células, que contenía el promotor de T7 ARNm polimerasa, una secuencia Kozak (unión de ribosomas), un codón de inicio, una etiqueta de epítipo de VSV-G N-terminal (Y'DIEMNRLGK), y una etiqueta de epítipo de HSV C-terminal (QPELAPEDPED) además del inserto de Rap55.

#### *Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (T<sup>2</sup>-ELISA) de Autoantígenos*

Realizado como en el Ejemplo 2, con las siguientes excepciones. Para el ensayo de indicador doble (diferente del ensayo de un solo indicador como se describe en el Ejemplo 2) no se colocaron pocillos adicionales al lado para detección de etiqueta de epítipo de VSV-G, ya que la etiqueta y la sonda (autoanticuerpo) se detectaron de forma secuencial en el mismo pocillo. Los anticuerpos etiquetados con enzima se añadieron de forma secuencial a los pocillos, seguido cada vez de lavado, como se describe en el presente documento. En primer lugar, se añadió un anticuerpo secundario monoclonal etiquetado con fosfatasa alcalina (AP) anti-[IgG humana] de ratón (reactividad cruzada mínima con inmunoglobulina de ratón; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA) diluido a 1/20.000 en BSA al 1%/TBS-T. A continuación las placas se agitaron durante 30 min. A continuación, las soluciones se descargaron de las placas de forma manual por inversión seguido de golpeteo vigoroso de las placas invertidas en una toalla de papel seco para retirar el fluido residual. A continuación, las placas se lavaron de forma manual como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 8. Este procedimiento se repitió para un anticuerpo monoclonal etiquetado con peroxidasa de rábano picante (HRP) anti-VSV-G (Clone P5D4, Roche Applied Science, Indianapolis, IN) diluido a 1/20.000 en BSA al 1%/TBS-T. Se generó una señal de quimioluminiscencia de AP

mediante la adición de 50 µl/pocillo de Sustrato de ELISA de Quimioluminiscencia de BM (Detección de Fosfatasa Alcalina; Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Alemania) siguiendo así su tercer fabricante. Después de permitir que la señal se desarrollara, las placas se leyeron como se ha descrito en el Ejemplo 8, seguido por una segunda lectura en la que PMT se ajustó con respecto a la señal más elevada en la placa. Después de la lectura de la placa, la placa se lavó de forma manual seguido por la adición de 50 µl/pocillo de Sustrato de Quimioluminiscencia SuperSignal ELISA Pico (Marca Pierce de Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Las placas se desarrollaron mediante agitación durante 15 min y a continuación se leyeron como se ha descrito en el Ejemplo 1, seguido de una segunda lectura en la que PMT se ajustó con respecto a la señal más elevada en la placa.

Diferente de los datos en la **Tabla IV**, los ELISA de indicador doble y de un solo indicador realizados para la **Figura 13** se lavaron con la ayuda de un lavador de placas robótico. De forma específica, las placas se lavaron 6x en TBS-T (pocillos llenos hasta el nivel máximo) en un Lavador de Placas Robótico ELx405 Select (BioTek, Winooski, VT). Después de la adición del suero, para evitar la contaminación del lavador de placas robótico con suero humano, las placas se lavaron posteriormente 4x mediante adición manual de TBS-T (pocillos llenos hasta el nivel máximo) seguido de aspiración al vacío y a continuación se lavaron 6x en el lavador de placas robótico como se ha descrito anteriormente en este Ejemplo.

#### *Resultados:*

En primer lugar, para establecer que el procedimiento de detección doble del T<sup>2</sup>-ELISA es tan eficaz como la detección individual, los inventores compararon directamente este uso de Rap55, un autoantígeno de PBC conocido, y una muestra de suero del paciente con PBC. Como se observa en la **Tabla IV-A**, la señal del autoanticuerpo (AP) [calculada como señal - ruido de AP (es decir, los mismos pocillos de expresión de suero con respecto a blanco)] del ensayo de indicador doble se calculó como un porcentaje de la señal del auto anticuerpo correspondiente a partir del ensayo de un solo indicador (AP). Ambos procedimientos proporcionaron resultados casi idénticos (la señal de AP del indicador doble fue de un 97 % del indicador individual correspondiente, la señal de HRP del indicador doble fue de un 96 % del indicador individual correspondiente), lo que demuestra claramente que la detección de la etiqueta de epítipo de VSV-G (HRP) no inhibe la posterior detección de la señal del autoanticuerpo (AP) en el mismo pocillo. Del mismo modo, la detección del autoanticuerpo (AP) no interfiere de forma significativa con la detección de la etiqueta del epítipo de VSV-G (HRP) en el mismo pocillo. Los inventores también calcularon las proporciones de señal con respecto al ruido para la señal del anticuerpo (AP): [calculado como señal/ruido de AP (es decir, los mismos pocillos de expresión de suero con respecto a blanco)] a partir del ensayo de indicador doble en comparación con el ensayo de un solo indicador (**Tabla IV-B**) y demuestran que la detección doble dentro del mismo pocillo no disminuye las proporciones de señal con respecto a ruido en lo más mínimo.

En segundo lugar, los ensayos de T<sup>2</sup>-ELISA de indicador doble indicador individual se compararon para varios pares de suero-antígeno. La **Figura 13** muestra datos a modo de ejemplo de T<sup>2</sup>-ELISA para sueros de paciente con lupus sistémico eritematoso (SLE), PBC y paciente normal con respecto a una diversidad de autoantígenos conocidos (CENPB, Ro-60, Smith B, y Sp140). Como una referencia, ya se sabía que las muestras eran positivas para los diversos autoantígenos como se informa mediante la anotación clínica de las muestras. Los valores de ELISA de Unidad de Autoanticuerpos se determinaron para cada par de suero-autoantígeno, para los que se calculó la desviación media y estándar (barras de errores) y se representaron en la **Figura 13** de forma individual para los autoantígenos mencionados anteriormente. Observar que se estableció un suelo de cero para las Unidades de Autoanticuerpo. De hecho, los sueros normales sometidos a ensayo con CENPB son negativos tal como se esperaba. Las proporciones de señal con respecto a ruido de resultados positivos variaban de 3:1 (Smith B con respecto a SLE-H) a 300:1 (SP140 vs. PBC-I-21). Este experimento también compara el ensayo de indicador doble con respecto a un ensayo de indicador individual mediante el cual se usaron pocillos separados únicamente para la detección de la etiqueta de epítipo de normalización de VSV-G. La posible ventaja de la detección del indicador doble es que cada señal de autoanticuerpo se normaliza por pocillo para una posible expresión de proteína (por ejemplo, día a día) o variaciones de captura (intra- o inter-ensayo). Los datos muestran perjuicio significativo con respecto al uso del ensayo de indicador doble. Además, tal como se esperaba, las desviaciones estándar del ensayo de indicador doble, que es una normalización por pocillo, son significativamente menores que las del ensayo de indicador individual, que normaliza solamente en una base por ensayo (por placa).

**Ejemplo 12:** Detección de Autoanticuerpos Frente a los Nuevos Autoantígenos HK1 y KLHL12 de Cirrosis Biliar Primaria (PBC) Expresados de forma Recombinante en un Sistema Basado en Germen de Trigo y se Somete a Ensayo Usando un Revestimiento de Autoantígeno Directo a la Superficie de la Placa de ELISA

#### *Autoantígenos y Ensayo de ELISA*

En este Ejemplo, una característica fundamental es que el ensayo de ELISA se realizó en placas de microtitulación de poliestireno revestidas directamente con autoantígenos expresados de forma recombinante purificados previamente (en lugar de captura/purificación de anticuerpo mediada *in situ* a superficie de placa de ELISA al igual que en el T<sup>2</sup>-ELISA). Otra característica notable es que EK1 y KLHL12 se expresaron en un sistema diferente en comparación con los Ejemplos anteriores. Las proteínas recombinantes de longitud completa HK1 y KLHL12 humanas expresadas en un sistema basado en germen de trigo sin células y purificadas mediante su etiqueta de fusión de GST N-terminal se adquirieron en Abnova (Taiwan). Las placas se revistieron durante la noche con 100 \*I

por pocillo de 0,5 µg/ml de proteína recombinante diluida en PBS. Como se detalla en el Ejemplo 2, las placas se lavaron a continuación 6x en TBS-T (pocillos llenos hasta el nivel máximo) y a continuación se bloquearon durante 30 min a 300 µl/pocillo en BSA al 1 % (p/v) en TBS-T. La solución de bloqueo se retiró de las placas y las muestras de suero (diluidas a 1/100) (diluyente de sistema de ELISA QUANTA Lite™ de INOVA Diagnostics; San Diego, CA) se añadieron a 50 µl/pocillo y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. El lavado de la placa y la adición del anticuerpo secundario se describen el Ejemplo 2. El ELISA se desarrolló usando el sustrato colorimétrico y la solución de parada del sistema de ELISA QUANTA Lite™ de INOVA Diagnostics (San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### Resultados:

La **Figura 14** muestra que el ensayo colorimétrico funciona bien para HK1 con respecto a varios sueros de PBC y normales y los resultados son concordantes en un 100 % con los resultados esperados (basándose en los resultados de micromatriz y T<sup>2</sup>-ELISA; véanse los Ejemplos 1 y 2). Observar que estas puntuaciones esperadas se indican como "+" y "-" en el gráfico. Observar que la línea de color rojo es el punto de corte para este ensayo (establecido en desviaciones estándar de 2 por encima de la media para las 4 muestras esperadas como negativas). También observar que se trata de revestimiento director de la placa con un antígeno recombinante y aquí no hay resta del fondo (no se necesita sin anticuerpo de captura presente). Por último, observar que de hecho se supone que N-03 es positivo (y PBC-04 y PBC-05 negativos) basándose en los resultados anteriores para los Ejemplos 1 y 2.

Del mismo modo, la **Figura 15** para KLHL12 muestra resultados del ensayo colorimétrico que son concordantes en un 100 % con los resultados esperados (basándose en los resultados de micromatriz y T<sup>2</sup>-ELISA; véanse los Ejemplos 1 y 2). Observar que estas puntuaciones esperadas se indican como "+" y "-" en el gráfico. El punto de corte se indica como la ley ni el color rojo y se estableció en 2 desviaciones estándar por encima de la media para las 4 muestras esperadas como negativas. Se espera que N-03 sea positivo y PBC-02 y PBC-07 negativos basándose en los resultados anteriores para los Ejemplos 1 y 2.

**Ejemplo 13:** Detección de Autoanticuerpos en Cirrosis Biliar Primaria (PBC) Usando Homólogos de HK1 y KLHL12

La información de los párrafos siguientes se obtuvo a partir de la base de datos de UniProt disponible al público [The-UniProt-Consortium (2009) Nucleic Acids Res 37: D169-74] así como en las diversas bases de datos de NCBI disponibles al público [National (United States) Center for Biotechnology Information].

La Hexoquinasa 1 (HK1) es una proteína que se localiza en la membrana externa de la mitocondria. El corte y empalme alternativo del gen que codifica HK1 da como resultado cinco variantes de transcrito que codifican diferentes isoformas. Cada isoforma tiene un extremo N terminal distinto pero el resto de la proteína es idéntico entre todas las isoformas [Sec de Ref de NCBI]. Por lo tanto, es razonable suponer que cualquiera de las isoformas mencionadas anteriormente sería suficiente para detección de autoanticuerpos para hexoquinasa 1 en Cirrosis Biliar Primaria (PBC).

Además, la Hexoquinasa 1 es un miembro de una familia de proteínas, que incluye Hexoquinasa 2, Hexoquinasa 3, Glucoquinasa (Hexoquinasa 4), y el Dominio de Hexoquinasa que Contiene 1. Las proteínas mencionadas anteriormente demuestran una homología de secuencia significativa, (por ejemplo, usando la herramienta de BLAST de NCBI, la HK1 y HK2 humanas tienen identidades positivas de un 73 % y positivas de un 86 %; Referencias de NCBI de secuencia de codificación BC008730.2 y NP\_000180.2, respectivamente) así como que comparten dominios conservados comunes, incluyendo los dominios \_1 y \_2 de hexoquinasa (pfam00349 and pfam03727, respectivamente), así como la Hexoquinasa de COG5026 de multidominio conservado [transporte y metabolismo de carbohidratos].

La Kelch-like 12 (KLHL12) es una proteína implicada en la conjugación de la ubiquitina ligasa y la ruta de señalización celular wnt. Contiene 6 dominios de repetición de kelch y un dominio de BTB (POZ). Existen varias proteínas Kelch-like y otras proteínas que contienen los dominios mencionados anteriormente (por ejemplo, véase la Tabla VI).

Debido tanto a la similitud de las secuencias de proteínas como a los fenómenos de dispersión de epítomos intra- e inter-moleculares [Vanderlugt y Miller (2002) Nat Rev Immunol 2: 85-95], los inventores esperan completamente que los homólogos de HK1 y KLHL12 mencionados anteriormente (véanse también los Ejemplos en la Tabla VI) presenten un rendimiento similar con respecto a la detección de autoanticuerpos específicos de enfermedad en Cirrosis Biliar Primaria (PBC). Además, el uso de homólogos puede aumentar la sensibilidad y/o especificidad del diagnóstico. En este Ejemplo, esto se evaluará.

#### Expresión de Autoantígeno

Se realizará como en el Ejemplo 3 excepto porque se expresan los homólogos de HK1 y KLHL12 y se usarán como autoantígenos para detección de autoanticuerpos, tal como los mencionados anteriormente en este Ejemplo y los ejemplos de homólogos enumerados en la Tabla VI.

*Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas de Etiqueta Doble (T<sup>2</sup>-ELISA) de Autoantígenos*

Se realizará como en el Ejemplo 3.

*Resultados:*

Como en el Ejemplo 3, para establecer umbrales de puntuación de diagnóstico para una especie de autoantígeno dado, el ensayo de T<sup>2</sup>-ELISA se realizará en un grupo de 22 sueros de pacientes normal y los puntos de corte se ajustarán a continuación a 2 desviaciones estándar por encima de la media para esta población base normal, para una confianza estadística ~95 %. El uso de este procedimiento a 2-3 desviaciones estándar es una práctica común (por ejemplo [Liu, Wang, Li, Xu, Dai, Wang y Zhang (2009) Scand J Immunol 69: 57-63]). A continuación, el T<sup>2</sup>-ELISA se realizará en 22 sueros de pacientes con PBC (por ejemplo, 22 negativo para AMA y/o 22 positivo para AMA). Los puntos de corte específicos de autoantígeno se usarán a continuación para puntuar los pacientes tanto normales como con PBC como aún su anticuerpo negativo o positivo. Los cálculos de Unidad de Autoanticuerpos y el procesamiento de datos se realizarán como en el Ejemplo 3. Los cálculos de sensibilidad y especificidad del diagnóstico para cada especie de autoantígeno se realizarán a continuación como en el Ejemplo 3.

Debido tanto a la similitud de las secuencias de proteínas como a los fenómenos de dispersión de epítomos intra- e inter-moleculares [Vanderlugt y Miller (2002) Nat Rev Immunol 2: 85-95], la expectativa es que al menos algunos de los homólogos de HK1 y KLHL12 muestren un rendimiento de diagnóstico similar al del Ejemplo 3 para PBC positiva para AMA y al del Ejemplo 4 para PBC negativa para AMA en la que se usaron HK1 y KLHL12 humanos por sí mismos. También se espera que alguno pueda funcionar mejor, ya sea en la sensibilidad del diagnóstico o la especificidad, o ambas.

**Descripción de las Figuras**

**Figura 1: Validación Previa Basada en ELISA del Autoantígeno de Hexoquinasa 1 (HK1) de PBC en Muestras de Suero Positivas y Negativas Seleccionadas de Forma Aleatoria a partir de los Análisis de Micromatriz.** Los datos representados en gráfico son del ELISA. Los símbolos "+" y "-" indican si un suero dado era positivo o negativo para autoanticuerpos de HK1 basándose en cualquiera del ensayo de "ELISA" o los análisis de micromatriz ("Matriz"). Las muestras de suero con el prefijo "N" son de individuos sanos, "PBC" de pacientes con cirrosis biliar primaria, y "SLE" de pacientes con lupus sistémico eritematoso. El cálculo de las Unidades de Autoanticuerpos a partir del ensayo de ELISA se detalla en el Ejemplo 2.

**Figura 2: Validación Previa Basada en ELISA del Autoantígeno de Kelch-Like 12 (KLHL12) de PBC en Muestras de Suero Positivas y Negativas Seleccionadas de Forma Aleatoria a partir de los Análisis de Micromatriz.** Los datos representados en gráfico son del ELISA. Los símbolos "+" y "-" indican si un suero dado era positivo o negativo para autoanticuerpos KLHL12 basándose en cualquiera del ensayo de "ELISA" o los análisis de micromatriz ("Matriz"). Las muestras de suero con el prefijo "N" son de individuos sanos y "PBC" de pacientes con cirrosis biliar primaria. El cálculo de las Unidades de Autoanticuerpos a partir del ensayo de ELISA se detalla en el Ejemplo 2.

**Figura 3: Validación Basada en ELISA del Autoantígeno de Hexoquinasa 1 (HK1) de PBC en una nueva Población Base de Pacientes con PBC Nunca Antes Sometidos a Ensayo en las Micromatrices de Proteoma.** Los datos representados en gráfico son las Unidades de Autoanticuerpo transformadas con Log<sub>2</sub> a partir del análisis de ELISA. El cálculo de las Unidades de Autoanticuerpos a partir del ensayo de ELISA se detalla en el Ejemplo 2. Las muestras del paciente se puntuaron como negativas o positivas para HK1 basándose en los valores de punto de corte (línea roja punteada) que se calcularon como se detalla en el Ejemplo 3. La región encuadrada en color rojo indica la población base de PBC y la región sin encuadrar la población base normal.

**Figura 4: Validación Basada en ELISA del Autoantígeno de Kelch-Like 12 (KLHL12) de PBC en una nueva Población Base de Pacientes con PBC Nunca Antes Sometidos a Ensayo en las Micromatrices de Proteoma.** Los datos representados en gráfico son las Unidades de Autoanticuerpo transformadas con Log<sub>2</sub> a partir del análisis de ELISA. El cálculo de las Unidades de Autoanticuerpos a partir del ensayo de ELISA se detalla en el Ejemplo 2. Las muestras del paciente se puntuaron como negativas o positivas para KLHL12 basándose en los valores de punto de corte (línea roja punteada) que se calcularon como se detalla en el Ejemplo 3. La región encuadrada en color rojo indica la población base de PBC y la región sin encuadrar la población base normal.

**Figura 5: Detección del Autoantígeno de Hexoquinasa 1 (HK1) de PBC en una Nueva Población Base Negativa para Antimitocondrial Anticuerpo (AMA) de PBC.** Los datos representados en gráfico son las Unidades de Autoanticuerpo transformadas con Log<sub>2</sub> a partir del análisis de ELISA, como se calcula en el Ejemplo 2. La línea roja punteada indica el umbral de puntuación de diagnóstico, como se ha determinado anteriormente en el Ejemplo 3. HK1 detectó 4 de 17 pacientes con PBC negativa para AMA (sensibilidad de un 24 %). Se debe indicar que, un paciente con PBC negativo para AMA (barra de color verde) se detectó con HK1 pero no se detectó con ninguno de los ensayos de ELISA aprobados por la FDA disponibles en el mercado en INOVA Diagnostics para PBC.

**Figura 6: Detección del Autoantígeno de Kelch-like 12 (KLHL12) de PBC en una Nueva Población Base Negativa para Antimitocondrial Anticuerpo (AMA) de PBC.** Los datos representados en gráfico son las Unidades de Autoanticuerpo transformadas con Log<sub>2</sub> a partir del análisis de ELISA, como se calcula en el Ejemplo 2. La línea roja punteada indica el umbral de puntuación de diagnóstico, como se ha determinado anteriormente en el Ejemplo 3. KLHL12 detectó 6 de 17 pacientes con PBC negativa para AMA (sensibilidad de un 35 %). Se debe indicar que, un paciente con PBC negativo para AMA (barra de color verde) se detectó con KLHL12 pero no se detectó con

ninguno de los ensayos de ELISA aprobados por la FDA disponibles en el mercado en INOVA Diagnostics para PBC.

**Figura 7: Diagrama de Venn - Nuevos Autoantígenos Específicos para PBC, HK1 y KLHL12, Captura Anteriormente Indetectable en Pacientes con PBC Negativa para AMA.** Cada número representa un paciente.

**Figura 8: La Detección de Hexoquinasa 1 (HK1) y Kelch-like 12 (KLHL12), Además de Ensayo de MIT3 de INOVA Diagnostic, Puede Revelar un Gran Número de Pacientes con PBC Sin Diagnosticar Previamente Con Tinción de Inmunofluorescencia Indirecta (IIF) Atípica.** Las muestras de suero con el prefijo "Cito" o "NM" son de pacientes con tinción con IIF de membrana citoplasmática o nuclear difusa, respectivamente. Para evitar efectos de escala, los datos representados en gráfico para cada antígeno se normalizan como un porcentaje de los pacientes que tienen las unidades máximas de autoanticuerpos para ese antígeno (ese paciente se marca con una flecha de color azul para cada antígeno). Los inventores establecieron el eje Y para puntos de corte de de MIT3 con INOVA de 25 unidades, que correspondían a un 17 %. Todas las barras mostradas en el gráfico representan resultados positivos y la falta de una /representa un resultado negativo. El "Alto Positivo" es un suero de control positivo seleccionado para cada uno de los autoantígenos.

**Figura 9A: Detección de HK1 Mediante ELISA Colorimétrico en Pacientes con PBC Seleccionados - Concordancia con la Lectura de ELISA de Quimioluminiscencia.** Los resultados del ELISA colorimétrico se representan como la señal menos el fondo, con el fondo siendo la misma realización de suero frente a un blanco de expresión (autoantígeno no expresado). La puntuación de ELISA de quimioluminiscencia se indica bajo el Eje X con un símbolo "+" (positivo) o "-" (negativo). Las puntuaciones para el ELISA quimioluminiscente eran las que ya se han determinado en el Ejemplo 4 para los mismos sueros. La barra con el resaltado de color verde corresponde a la misma muestra del Ejemplo 4 (PB-AMN-044) para puntuación negativa en todos los ensayos de ELISA de PBC disponibles de INOVA Diagnostics pero positiva para HK1.

**Figura 9B: Detección de KLHL12 Mediante ELISA Colorimétrico en Pacientes con PBC Seleccionados - Concordancia con la Lectura de ELISA de Quimioluminiscencia.** Los resultados del ELISA colorimétrico se representan como la señal menos el fondo, con el fondo siendo la misma realización de suero frente a un blanco de expresión (autoantígeno no expresado). La puntuación de ELISA de quimioluminiscencia se indica bajo el Eje X con un símbolo "+" (positivo) o "-" (negativo). Las puntuaciones para el ELISA quimioluminiscente eran las que ya se han determinado en el Ejemplo 4 para los mismos sueros. La barra con el resaltado de color verde corresponde a la misma muestra del Ejemplo 4 (PB-AMN-263) para puntuación negativa en todos los ensayos de ELISA de PBC disponibles de INOVA Diagnostics pero positiva para KLHL12.

**Figura 10: Transferencia Puntual Colorimétrica de Autoantígeno HK1 de PBC Sondeado con Sueros de Pacientes con PBC y Normal.** El Autoantígeno HK1 de PBC recién descubierto se aplicó de forma puntual en nitrocelulosa, así como el tampón (control negativo) e IgG humana (control positivo). Se permitió que los sueros diluidos de un paciente con PBC y paciente normal se unieran y se lavaron antes de la adición de IgG anti-humana etiquetada con oro coloidal. "hlgG" es el control positivo de IgG humana; "AAg" es el nuevo autoantígeno HK1 de PBC; "Ctrl" es el control negativo (tampón de vehículo).

**Figura 11: Comparación de T<sup>2</sup>-ELISA con respecto a ELISA Comercial (INOVA Diagnostics) Usando el Autoantígeno de Sp100 y Sueros de PBC.** Las muestras de suero con el prefijo "PBC" son de pacientes con cirrosis biliar primaria. Las regiones encuadradas de color rojo representan resultados de ELISA de INOVA; las regiones encuadradas de color amarillo representan resultados de T<sup>2</sup>-ELISA. \*Las unidades por encima del control "Bajo Positivo" (línea de color rojo) se puntúan como diagnósticamente positivas.

**Figura 12: T<sup>2</sup>-ELISA Con Respecto A ELISA Convencional para Detección de Autoanticuerpo de p53 en Sueros de Cáncer.** Los sueros normales se presentan con un prefijo "N" (caja de color verde) y todos los demás son sueros de CRC. Los datos se normalizan como un porcentaje de los sueros máximos para ese ensayo.

**Figura 13: Ensayos de T<sup>2</sup>-ELISA de Indicador Doble y de Indicador Individual con respecto a Diversos Pares de Suero-Antígeno.** Los datos representados en gráfico son las Unidades de Autoanticuerpo del análisis de ELISA. El cálculo de las Unidades de Autoanticuerpos a partir del ensayo de ELISA se detalla en el Ejemplo 12. El texto de color azul representa el antígeno. Las muestras de suero con el prefijo "N" son normales (de individuos sanos), "SLE" de lupus sistémico eritematoso y "PBC" de cirrosis biliar primaria.

**Figura 14: Detección de Autoanticuerpo en ELISA con Autoantígeno de Hexoquinasa 1 (HK1) Humana Purificada Previamente Revestida Directamente a Superficie de Placa de Microtitulación de Poliestireno.** El autoantígeno de proteína recombinante expresada purificado previamente se unió directamente a la superficie de la placa de ELISA de microtitulación de poliestireno y se usó para someter a ensayo el suero del paciente para la presencia de autoanticuerpos. El resultado esperado, basándose en datos previos de micromatriz y T<sup>2</sup>-ELISA (Ejemplos 1 y 2), se enumera a continuación en el eje X como "+" (positivo para autoanticuerpo) o "-" (negativo para autoanticuerpo). El resultado real del ensayo en este Ejemplo, se muestra basándose en el punto de corte de la puntuación en el gráfico de barras (línea punteada de color rojo), que se calculó como 2 desviaciones estándar por encima de la media para las 4 muestras negativas esperadas.

**Figura 15: Detección de Autoanticuerpo en ELISA con Autoantígeno de Kelch-Like 12 (KLHL12) Humana Purificada Previamente Revestida Directamente a Superficie de Placa de Microtitulación de Poliestireno.** El autoantígeno de proteína recombinante expresada purificado previamente se unió directamente a la superficie de la placa de ELISA de microtitulación de poliestireno y se usó para someter a ensayo el suero del paciente para la presencia de autoanticuerpos. El resultado esperado, basándose en datos previos de micromatriz y T<sup>2</sup>-ELISA (Ejemplos 1 y 2), se enumera a continuación en el eje X como "+" (positivo para autoanticuerpo) o "-" (negativo para autoanticuerpo). El resultado real del ensayo en este Ejemplo, se muestra basándose en el punto de corte de la puntuación en el gráfico de barras (línea punteada de color rojo), que se calculó como 2 desviaciones estándar por

encima de la media para las 4 muestras negativas esperadas.

**Figura 16: Datos de Autoanticuerpo de Micromatriz de Proteoma (ProtoArray) Normalizados a Cuantil para Hexoquinasa 1 (HK1) Humana para 92 Muestras de Suero Distintas.** La intensidad de la señal de fluorescencia del autoanticuerpo, "Señal de la Matriz" (normalizada a cuantil a través de todo el conjunto de micromatriz de 92 miembros en una base por lotes), para cada una de las muestras de suero del paciente se muestra para el nuevo autoantígeno humano HK1. PBC = Cirrosis Biliar Primaria; Normal o Norm = Individuos sanos, SLE = Lupus Sistémico Eritematoso; SjS = Síndrome de Sjögren; CRC = Cáncer Colorrectal; AIH = Hepatitis Autoinmunitaria.

**Figura 17: Datos de Autoanticuerpo de Micromatriz de Proteoma (ProtoArray) Normalizados a Cuantil para Kelch-Like 12 (KLHL12) Humana para 92 Muestras de Suero Distintas.** La intensidad de la señal de fluorescencia del autoanticuerpo, "Señal de la Matriz" (normalizada a cuantil a través de todo el conjunto de micromatriz de 92 miembros en una base por lotes), para cada una de las muestras de suero del paciente se muestra para el nuevo autoantígeno humano KLHL12. PBC = Cirrosis Biliar Primaria; Normal o Norm = Individuos sanos, SLE = Lupus Sistémico Eritematoso; SjS = Síndrome de Sjögren; CRC = Cáncer Colorrectal; AIH = Hepatitis Autoinmunitaria.

Tabla I: Autoantígenos de Cirrosis Biliar Primaria (PBC)				
Referencia de GeneBank de NCBI (ID de Codificación de Ácido Nucleico Para Proteína)	Gen	Encabezado/Descripción de Fasta	Valores de P. de Estadística M.	Sensibilidad (S) y Especificidad (P) del Diagnóstico en PBC con respecto a todos los que No tienen PBC
BC008730.2	HK1	>gi 33869444 gb BC008730.2 hexoquinasa 1 de <i>Homo sapiens</i> , variante 1 del transcrito, ARNm (clon de ADNc MGC:1724 !IMAGE:3163056), cds completa	0,0000000012	Con el Procedimiento de Hit Calling: (S) 89 % (P) 84 %  Con el procedimiento de Estadística M.: (S) 85 % (P) 90 %
NM_021633.2	KLHL12	>gi 21361889 ref NM_021633.2  <i>Homo sapiens</i> kelch-like 12 ( <i>Drosophila</i> ) (KLHL12), ARNm	0,000076	Con el Procedimiento de Hit Calling: (S) 3 % (P) 98 %  Con el procedimiento de Estadística M.: (S) 40 % (P) 97 %

15

**Tabla II: Resultados de ELISA Reunidos para Autoantígenos Específicos para PBC en Sueros de PBC Negativos para Anticuerpo Antimitocondrial (AMA)**

Suero Negativo de AMA Positivo para PBC						
Paciente	INOVA				AmberGen	
	AMA IgG	ep210	sp100	PBC Screen IgG	AMA IgG	AMA IgA
PB-AMN-005	-	-	+	+	+	-
PB-AMN-031	+	-	+	+	-	-
PB-AMN-033	+	-	E	+	-	-
PB-AMN-077	-	-	+	E	-	+
PB-AMN-095	-	+	-	+	E	-
PB-AMN-105	-	+	-	-	-	-
PB-AMN-109	-	-	+	+	-	+
PB-AMN-110	+	-	+	+	-	+
PB-AMN-120	+	+	-	+	+	+
PB-AMN-217	-	-	+	+	-	-
PB-AMN-223	-	-	+	+	-	-
PB-AMN-224	-	-	+	+	-	+
PB-AMN-225	-	-	+	+	-	-
PB-AMN-262	-	-	+	+	+	-

	Negativo para los 4 ensayos de INOVA pero detectado mediante AmberGen
	Negativo mediante ensayos de INOVA y AmberGen
E	Presencia o ausencia equívoca de autoanticuerpos imposibles de determinar

**Tabla III: Puntuaciones de ELISA para Sueros de Paciente con PBC.**  
 E = equivoco, es decir, inconcluyente (demasiado cercano al punto de corte; usado solamente en el ensayo de INOVA). Las filas sombreadas de color naranja indican muestras negativas para Sp100 pero positivas para Sp140.

ID del Suero	Sp100		Sp140
	Puntuación de INOVA	Puntuación de T <sup>2</sup> -ELISA	Puntuación de T <sup>2</sup> -ELISA
PB-AMP-002	+	+	+
PB-AMN-005	+	+	-
PB-AMP-006	-	-	-
PB-AMP-011	-	-	-
PB-AMP-018	+	+	-
PB-AMP-020	-	-	-
PB-AMP-021	+	+	+
PB-AMP-024	+	+	-
PB-AMP-029	+	+	-
PB-AMN-031	+	+	-
PB-AMN-033	E	-	-
PB-AMP-036	+	+	-
PB-AMP-038	+	+	-
PB-AMP-039	+	+	+
PB-AMP-046	-	-	-
PB-AMP-047	+	+	+
PB-AMP-048	+	+	-
PB-AMP-059	+	+	-
PB-AMP-063	+	+	-
PB-AMP-066	+	+	-
PB-AMP-068	E	-	-
PB-AMN-077	+	+	+
PB-AMP-080	+	+	-
PB-AMP-084	-	-	-
PB-AMP-102	+	+	-
PB-AMN-109	+	+	+
PB-AMN-110	+	+	-
PB-AMP-113	+	+	-
PB-AMP-122	+	+	+
PB-AMN-217	+	+	+
PB-AMP-218	+	+	-
PB-AMN-223	+	+	+
PB-AMN-224	+	+	-
PB-AMN-225	+	+	-
PB-AMN-262	+	+	+

Tabla IV: El ELISA de detección doble es tan eficaz como el ELISA de detección individual

**A. T<sup>2</sup>-ELISA de Indicador Individual (Control) con respecto a Indicador Doble (Porcentaje de Control) Frente a Autoantígeno de Rap55 y Suero de Paciente con PBC**

Porcentaje de Control		
Sondas Añadidas Etiquetadas con Indicador	Detección de AP (Autoanticuerpo)	Detección de HRP (Expresión de Autoantígeno de Rap55)
anti-VSV-HRP	0,02	100,00 (control)

(continuación)

<b>A. T<sup>2</sup>-ELISA de Indicador Individual (Control) con respecto a Indicador Doble (Porcentaje de Control) Frente a Autoantígeno de Rap55 y Suero de Paciente con PBC</b>		
<b>Porcentaje de Control</b>		
<b>Sondas Añadidas Etiquetadas con Indicador</b>	<b>Detección de AP (Autoanticuerpo)</b>	<b>Detección de HRP (Expresión de Autoantígeno de Rap55)</b>
AP anti-humano	100,00 (control)	0,23
anti-VSV-AP, a continuación AP anti-humano	97,38	96,48
<b>B. T<sup>2</sup>-ELISA de Indicador Individual (Control) con respecto a Indicador Doble Frente a Autoantígeno de Rap55 y Suero de Paciente con PBC (Señal con respecto a Ruido)</b>		
<b>Señal con respecto a Ruido</b>		
<b>Sondas Añadidas Etiquetadas con Indicador</b>	<b>Detección de AP (Autoanticuerpo)</b>	<b>Detección de HRP (Expresión de Autoantígeno de Rap55)</b>
HRP anti VSV	3,98	697,86 (control)
AP anti-humano	20.15 (control)	4,51
AP anti-VSV, a continuación anti-humano	20,22	760,00

Tabla V Secuencias de Hexoquinasa 1 (HK1) Humana y Keich-Like 12 (KLHL12) Humana en ProtoArray v4.0 (Introgen Carlsbad CA) (Ejemplo 1) en el T-ELISA (varios Ejemplos) y en el ELISA Convencional del Ejemplo 12

NCBI GenBank de Referencia de Proteína	Encabezado/Descripción de Fasta	Secuencia
<p>BC008730.2</p>	<p>&gt;gi 33869444 gb BC008730-2 hexoquinasa 1 de <i>Homo sapiens</i>, variante 1 del transcrito, ARNm (clon MGC:1724 de ADNc IMAGE:3163058), cds completa</p>	<pre> NTAQLLAYPTEARDDQVKIKDKILYANRLSDETIIDIMTRFRKKNKNGLSRDFNFTA TVKALPFTVRSIIPQSEKAGDFIALDLAGGSFRIARVQVNHKKNQVHMESEVDTPENI VHGSGSLFDHVAECLGDFNERKIKDKLPGVFTFSFFCQQS KIDERAILITWTRKFA SGVGAOVVLLNKAIKERGQYDAMI VAVVNDIVGTHMTGDIIDDDQCEVGLIIGTGNA CYKELRHIDLVGDEGRMCINTENGAFDGGSLIEDIRTEFDRBIORCSLNPCKQLFEK MYGNYLGEVLRLILVWNAKEGLLEFGLITPELLTGRFTEDVSAIERNKECLHNAKE ILTRALGVPEPSDDDCVSVQMVCTI VSFSAANLVAATIGAILNRLRDNKGTPLAKTIVGVD TLAHFHLTKOMLLEVKENRABEMELGLAKQTHRNAVVEMLPSFVRATPDGTENGDFLAL DLGTFNFRVLLVLCISGKRTVENKLYAIPILNQGTCEELFDHIVSCI SDFLDYHG LEKGRPELGFETFSFPCQQTSLONGILITWTKFKAIDCVCHDVVTLARDAIKRREDFDL DVAVVNDIVGTHMTCAAYEEPTCEVGLIVGYSNACIMESNAVENVEGQDQDCINME KQAFGONGCLDIDIRHVDRLVDEYSLNAGKQRYEMISGRNYLGEIIVRMILIDFTKGFLL FRGQISETLATRGIPEINFLSQIESDRLLALLOVRAILOQLGLNSTCDD99ILVKTVCQVY SRRAHQCGAQAIAVWDKIRENRGLRDLVVTVGVDGTLVRLLEP HFFERHMQTVNELSPK CNVSETLSEDSGKGAALITAVGVRLATPSS                     </pre>
<p>NM_021633.2</p>	<p>&gt;gi 21361889 ref NM_021633.2 keich-like 12 de <i>Homo sapiens</i> (Drosophila) (KLHL12), ARNm</p>	<pre> MGLMAPKOTKTHAKSILNSMNSLKSNTLCCDVTLRVDEKDFPAHRIVLAACSDFYC AMPTSESEKGPYVDIGGLTRSTHEILDIFYTETHVVTENVOELLPAACLQLKGV KQACCFLESQLOP SNCLGIDFDFASTHNCVDLQAAEVFSQKHFFEVVQHSFLLSQG EYKLLKCDLQVDSSEFVFAVIVKNAKERESELPNLLQYVRPLA7PRTIDVYI IDVVENYDPTQSKSFLY9ITRXYAVASVSLRDAIYVIGGYDGRSRLSSVECLDYTAD DAEPPFIRC SLQCRDLVDEAKKFLRPELRSQNGPRTAARLGNNEVLLVVGSGFSQSP EDQWYSVAPMNVARGLAGATTIGEMYYVSGGFGCSRRHTSMERYDPNIDQMSHLGDMO YAREGADVVAGSVIYCLGGYDGLNLSNVEKYDPHTGHNTVYTPHATRSRAGVALIN DAILVYGGFDGTAHLSVEAYNIRTDSHTTVTSMTPRCYVGGATVLRGRUYA TAGYDGN SILSRTEVNDITINREKVVWPSMKTORCDAGCVFVLSFK                     </pre>

(continuación)

<p>T<sup>2</sup>-ELISA - HK1 y KLHL12 humanas recombinantes sin células expresadas en un lisado de reticulocitos de conejo. Observar que las secuencias subrayadas son etiquetas de epítipo N-terminal y C-terminal añadidas de forma exógena así como secuencias derivadas de vector.</p>	<p>&lt;gi 51484591 gb CV028580.1 CV426580.4566 ADNc de longitud completa del ADNc de <i>Homo sapiens</i> de la Colección de Genes de Mamífero similar en la posición 5' a BC008730 (HK1), secuencia de ARNm</p>	<p>MAIYTDIEMNRLGSMIAQALLAYEFLKDDVVKIKDKYLVAARLSDETLIDWTRFRK ENKNGLSRDNFPAIVYKMLPFFVRSI PGGSEKGDPIALDLGGSSFRILAVQVNHKRNOM VIMSESVYDTPENLVKSGSOLFVAVKCLGDMFKRKYIKOKKLVFVGFYFSPCCQSKI DEAILITWTRFRASGVGEGADVVELLANKALKRGGDYDANI VAVVNDTVGTMATCGYDQD RCVEGLIIGTGTNACVMSLRHI DLVGDGGRNICINTEWGFACDDGSDIEDIRTEFDREI DRGSLNPGKQLFERVNSCMYLGELVRLILVMAKRGILLFEGRITPELLTRGKFTSDVS AIEMKREGLNHAKIEILRLGVPEPDDCVSVQHVCTIVSFRSANLVAANTLGAIALNRLRD NEGTPRLRTVGVVDSLYKTHPQYSRRFHKTLLRLLVPSDVRELLSBSGSGKGAAYTA VAYRLAEQRQIEETLAHFHLTKMLLEVYKRRARAMELGRKRQTHNNNAVVKMLP9FVR RTPDGTENGDFLALDLAGSTNFRVLLVVKIRSGKRTVEMHNIYAIPIETMQGTGEBELFD HIVSICISDELDMYGIKGFNPLGFTFSFPCQQTSLDAGILITWTKGPKATOCVGHQVVT LLRDAIKRREEFOLDVVAWVNDTVGMTTCAYEETCEVGLIVGTGSRNACVMEEMKIVE HYEGDQGMCIINEMGAFQDNGCLDDIRHYDLVDSYSLNAGKORYEMISGNYLGEI VANILIDFTKKGELFRGQISETLKTGIFFTKLSQIESDRLLALQVRAILQQIQLNST CDDSLVKTVCVYVSRRAAQICCGAGNAVVVDKI RERGLDRLNVTYVVDGTLKLEHPHF SRINHQTVKELSPKCNV5FLLSEDCSGGARLITAVGVRLATVETASSLSRELVDPNSVQA RLQDVGDTIDTRSKLAAAGLYTRASQPELAPEDPEDEHHEHHHH</p>
<p>CV026580 (EST)</p>	<p>&lt;gi 13112018 gb BC003183.1 kelch-like.12 de <i>Homo sapiens</i> (Drosophila), ARNm (clon MGC:4435 de ADNc IMAGE:2858852), cds completa</p>	<p>MYTDIEMNRLGSMGIHAPKDIHTWTRKSIINSMNLSLKNSTLDCDVTLRVEQKDFPAH RIVLAACSDYFCAMFTSELSEKGPYVDIQGLTASTWBIILLDFVYVTEVHTVENVOEL LPAACLLQKGVKQKCCFEFLSOLDPNSCLGI RDRFETHNCVDIMQAEYFSQKHFPEV VQHEEFTLLSQEVEKLIKDEIQDSEEPVFEAVINWVKRAKREESLPLNLIQYVAM PLATPRYITDVIDAEPFPCISLQCRDLVDEAKKFLRPELRSQMCGPRPARLGADEVL LVVGGFGQOSPIDWERYDPKQMSFLPSITRKRKYVASVSLHDRIYVIGGYDGRSR LSSVECLDYADEDGVWYSVAPMNVRLAGATTLDGMIYVGGGFGSRRRTSNERYP NIDQSNLGDHQTAREGAGLVVAGVIYCLGGYDGLNIIINSVEKIDPHTGHWTNVTMA PRSGAGVLLANDHAIYVYGGFDGTAHLSVVEAYNIRTDSWTWTTSNTTPRCYVCAIVLR GRUYA IAGYDGNLSLSSIECYDPI IDSWREVVT SNGTQRCDACVCLREKQPELAPEDPE D</p>

(continuación)

<p>AAH08730</p>	<p>&gt;gil14250554 gb AAH08730.1 Hexoquinasa 1 [Homo sapiens]</p>	<p>NIQAOLNAYFTELKDDQVKIKDKYLAMRLSDLELIDIMTRFRKRNKGLSRDPNPTA TVKMLFTFYASIPGSEMGDFIALDLGSSFRILRVQVHEKKNQVHESEVYDTEENI VHGSGSGLFDHVAECLAGDFNEKRIKDEKLFGVFTSFPCCQSKIDEAELIITWTRFKA SGVEGADVTLNKAIRKGGYDANI VAVVNDTVGTNTWCYDDQHCVEGLIIGTGTNA MYNEELRHDLVEGDEGRMCITWENGANGDGSLEIDRTEDRAEIDRGSINPGKQPFER KYSMYLGLVRLILVKNAREGLAFEGRITPELLTRCKNTSDVSAIENNEKGLHNAKE ILRLGVEPSDDDCVSVQNVCTIVSFRSABLVAATLCAILNRLRNKGTFRLLRTVVGD GSLYKTHPQYRRTHRTJRRLVVDSVDFALSSESGCKGAMVTVAVAYRLAEHQHQIEE TLAHPHILKDMLLSEVKEKRRBAEMBLGKARQTHNNAVVKMLPSFYVRTPDGTEGDFLAL DLGGTVFRVLLVKIRSGKRTVEMHNKIYAIPIEIMQSTGEELFDHIVSCI SDFLDTMG IKGPRMPLGFTESFPCCQTSLOAGILITWTKFKATDCVGHVTVLLADALIKRREFDL DVVAVVNDTVGTNTCAYEESPTEVGLJVTGSGNACVHEKKNQVHESEVYDTEENI NGAFGNGCLDDIYTHYDRLVDEYSLNCKQRYEKNI8GMYLGEIVRNILIDFTKAGFL FRGQIS ET LKTRGIFETFLSQIESDRLLALQVRAILIQQLGCLNSTCDDSIILVTVCGVV SRRARQCGAGAAVVDKIRENRGLDRLVTVGVDTGLYKLHPHPSRIMHQTVKELSPK CNVSELLSEDSGSGKGAALITAVGVRLRTEASS</p>
<p>NP_067646.1</p>	<p>&gt;gil11056006 ref NP_067646.1 ketch-like 12 [Homo sapiens]</p>	<p>HGGINAPKDIMTWHAKSILLNSMNSLRKSNLTCDDVTLRVQKDFPAHRIVLAAACSDYFC AMFTSELSERKGFYVDIQGLTASTHEILLDFVYTFVHVTVENVQELLPAAQLLQKGV KQACCFLESQDPNCLGIRDFAETENCVDLMAAEVFSQRHFEVYVQHEFILLSQG EVEKLIKCDSEIQYDSEEPVFEAVINNVKHAKEEESLPHLLQYVMEFLLPYITDVI DAEPEIKCSLQCRDLVDEAKNFHLAPELNSCMQGPTRFARLGAHEVLLVYGGFSGQSP IDVVEKYDPTQMSFLPSITKRRYVASVSLHRIYIYIGYDGRBRSSVECLDYTRD EDGVYSVAPMRYRGLAGATTLGIMIVYVSGGFDGSRHHTSMERYDPTIDQMSRLGDIQ TAREGGLVVASGVICYLGGYDGLNLASVEKYDPTGHHTVTPNATKRSAGVALLN DHIYVYGGFDGTAHLSSVEATNIRTDSTWTVTSMTPRCYVATVLRGLRYAINGYDGN SLLSSTECYDPIIDSEBVTSMGTURCDAGVCVLREK</p>

Tabla VI Ejemplo de Secuencias Homólogas para AK1 y KLHL12

Referencia de Proteína de NCBI (Nombre del Gen)	Encabezador/Descripción de Fasta	Secuencia
<p><b>HEXOOQUINASA 1 y Homólogos</b></p> <p>NP_277031.1 (HK1)</p> <p>&gt;gil15991827/ref NP_277031.1 isoforma HK1-R de hexoquinasa 1 (variante 2 del transcrito) [Homo sapiens]</p>		<p>NDCBHSLSLPCRAEAWAWEIGIDKLYANRLSDETLIDIMFRFRKRNKNGLSRDENPTATVK          KLPTFVRSIPDGSSEKDFIALDLGSSFRILRVQVNHKNHWNHMSVYOTPENIVHSGS          SOLFDVNAECLGDFEKRKIYEDKALPVGFTSFFCOOSKIIDEALITWTRAFKASGVEAD          VVLLNKAIKRGDYDANIIVAVVHDIVGTMTCGYDDQCEVGLIIGTGNACYNELASHI          OLVEGEGRMCIINTEGAFCDDGSLIEDIKTEFDREIDRGLNPKQLFERKAVSGMYLGSVL          RLILVKAKEGLLFEGRITPELATRGKENTSDVSAIEKKNKEGLHNAKELTALGVGSPSDH          KTLRRLVPSDVRFTLISESGKGAHVAVAYRLAQRHQIETLARHFLTKOMLLEVKK          CYSVQVCTIIVSRSNLVATLGAIALNLRDNKGTFRLATTVQVDSLYKTHPQYSRAFH          RMAEMELGRKQTHHNAVVKLPSFVARTDGTENGDFLALDLGGTNRVLLVRIKRSCKK          RTVENHNIYALPIELMQGTGEELFDHIVSCI SDFLDYMGICGFMPLGFTSFFCOQTSL          DAGILITWTKFKATDCVGHUVVLLRDAIKRREFTDVAVVDVTVGTMTCAYEETPC          EYGLIVGTGSNACIYBENKIVVEGDDGQNCINMEGAFDGNOCLODDIRHYDRUVDYB          LNAGKQRYEKISGMYLGEIVRNLIIDFKKGFLEGOIS ETLATRGI FETKFLSQIESDR          LALLQVRAILOQLGANSTCDDSLVYKIVCGVVSRRBAQLCCAGHNAVVDKIRENRCLOLN          VTVGVDSTLYKLNHPFSRIWKQTVKELSPKCNVSEFLS EDGSGKGNALITAVGVRLRYAS          S</p>
<p>NP_000180.2 (HK2)</p> <p>&gt;gil15553127/ref NP_000180.2 hexoquinasa 2 [Homo sapiens]</p>		<p>MTASHLLAVFTEELNHDQVKVDYLYMRLSDETLLEISKRFRKEMKGLGATTTPTAAV          KMLPTFVRSPTDGTSEHGFALDLGGTNRVLRVVDNGLQKVRHENQIYALPEDIRHGS          GTQLFDRIAECLANFMKLIQIDKLLPLGFTSFFCHQTKLDEFLVSWTKGSKSGVEGR          DVVALLREAIQRGDFDIDIVAVVHDIVGTMTCGYDDHNCISGLIVGTGSNACIYBENH          IIMVDEGEGRMCIINTEGAFDGSLLNDIRTEFDQSI DMGSLNPKQLFERKISGMVKGEL          VRLILVMAKEELLFGGKLSPELLATRGFKTDI SDIEGKDGIRRAEVLNRLGLDPTQE          DCVATHRIQIYSTRSASLCAATLAAVLQRIKENKGERLRSITIGVDSVYKRNHPFARRL          HKTVRALVPCDVRFLAS EDGSGKGAHVAVAYRLAQRHQIETLARHFLTKOMLLEVKK          RRMVEBERGLSKETHASAPVYRMLPTVCA TP DGTENGDFLALDLGGTNRVLLVVRNKG          WGGVENHNIYALPIEYVNHGTGDELFDHIVQCIADFLPYMGKGVSLPLGFTSFFCOQNS          LDSSILKRWTKFKASGCEGDVTLLEAIIHREEFQDVAVVDVTVGTMTCGREDPH          CEVGLIVGTGSNACIYBENRIVVELVEGEGRMCIYBENKIVVEGAFDGNOCLODDIRHY          SLNPKQRYEKISGMYLGEIVRNLIIDFKKGFLEGOIS ETLATRGI FETKFLSQIESD          CLALLQVRAILOQLGANSTCDDSLVYKIVCGVVSRRBAQLCCAGHNAVVDKIRENRCLOLN          RVTYGVDDSTLYKLNHPHTAKVNHETVKDLAPKCDVSEFLQSE DGSGKGNALITAVACRIEAG          OR</p>

(continuación)

Tabla VI Ejemplo de Secuencias Homólogas para AK1 y KLHL12	
Referencia de Proteína de NCBI (Nombre del Gen)	Encabezador/Descripción de Fasta
	Secuencia
<b>HEXOQUINASA 1 y Homólogos</b>	
NP_002106.2 (HK3)	<gi 194097330 ref NP_002106.2 hexoquinasa 3 [Homo sapiens]
	<pre> MDSIGSGLRGEETLSCSEDEGLPGFSSSELYVECLQQFRVTRAGLQQIQASLLGSMEQA LRQASPAVVRMLPT YVGSTFRGTGGDFVAVLWELGATGASLRVAVLVTTGTEGHRVEPRS QSFVYFCSEVNLGAGQQLTFPAARCLSEFLDAQPUNKQLGLGFPSPFCHQTGLDRSTLIS WTRGFRCSVEGQDQVYQLLRDAITRRGAYNI DVVAVVRDVTGTMICEPCGVRFCVGLVVD TGTWACYMEEARHVAVLDRDRGRCVSVENCSFSDGALGPVLTATFDTLKHESLNPCRQ FERNIGGLYLGEIVLVLATLARCGLVIFGGCTS PALLSGS ILLEHVREHEDPSTGAARVH AIIQDLGLSPGRSDVELVQRVCAAVCTRAAQLCAAAALAVLSCIQHSREBQQTLQAVAYGG RVCEHPRFCSVLQGTVNLAP ECDVSLI PVDGCGGVAVYTVAAARLAAHRRLLAETLA PFRNLHDQLAAVQMGRRKMAKGLRGEASSLMLPTFYVRAITFDGSEGRDFTLALDLGGTNFR VLLVVRTTGVQITSEI YSI PETAQGSQQQLFDHI VDCITVDIQKGLSQSLPLGTFSE PCRQLDQGLLHRTKGETRASDCGQDPPVSLLEAITRRQAVELRVVAILVNDVTGTRNSC GTRDPFCEIGLIVGTGNACTYMEELARVAGVPGDSGRACINMSWCA FGDGGSLLAMLSTRFD ASVDAQSINPKQRFERMI SGNYLGEIVRH ILLHLTSLGLVTRGQOIQRQLTRQIIFRTRFL SEIESDIALANQVRAITLEDLGLPLTS DQALAVLVEVQNAVSRARQLCGAGVAAVVERIKEN RGLLELAVSVGVDTGLYKLNHPNFSLLVNAITVRELA PRCVVTFLQSEDDGSGKGAALVTAVAC RLAQLTRV </pre>
NP_277042.1 (HK4)	>gi 15967159 ref NP_277042.1  isoforma 2 de glucoquinasa [Homo sapiens]
	<pre> NANDVTRSOQTALTLVQILAEFOLQEDLNKVRMQRKEMDRCLRLLETHEASVRLMPT YVRSYTPGSEVGDFLSLDLGGTNEFVRLVYVGESEGQMSVKTXXHQHSI PEDAMTGTBPH LFDYISECISDFLQRHQMKKLPGLFTFS FVVRHEDIDKGLILNWTGFKASGAGQNVV GLLRDAIKRRGDFEMDVVAWYNDTVA THISCY EDHOCSEVGMIVGTGNCNACTNEEMQVVL VEGDGRNCVNTENGAFGDSGELDEFLLVDRLVDES SANFGQQLYEKLIQGGYKGLVRL VLLRLVDELLFRGEASEQLRTRCAFETRFYSQVESDTCDRKQIYNIISTLGLRPSITDCD IVRACESVSTRAAHMC SAGLAGVINRRRSRSEDVNRITVGVDCSVYKLLHPSFKRERPHAS VRRLLTPSCEIYPIESSESGRGAALYSAVACKKACMLGQ </pre>

(continuación)

Referencia de Proteína de NCBI (Nombre del Gen)	Encabezador/Descripción de Fasta	Secuencia
MP_079406.3 (HKDC1)	>gij156151420 ref NP_079406.3  dominio de hexoquinasa que contiene 1 [Homo sapiens]	<p>HFVAVLMAFYSKLKEDOI KVDRLYHMLRSLDDTLIDIMRFRRAEMKGLAKDQTPAAV          KMLPTFYNAIPDGSSENGEFLSLDLOGGSRFRVLKQVAVEGKRKHVQESQFYPTFNEIIGN          GTELFTYVADCLADFTMTKDLKHKLPLGLTFSFPCROTKEGVLQSSWTKFKRARGVQOT          DVVSRLYKMRBRHMDVDIILVNDYVGTMTCAVDYDQYCEVGYIIGTGTACYNEDSN          IDLVGGDGRNCINTEGAFDGDGALIEDIRTEFDRELDSLAPGNQLEKMIISGLYLDEL          YRLIILKMAKAGLLFGKESBALHTEGKIEIETRHVAAMERYKEGLANTREILVDLGLPSEA          DCTAVQHVCTIVSFRSANNLCAANLAAIILTRAKENKVERLRTTVGRDGTLYRIHPQVPEKL          HKVVKLVPSCDWRPFLSESGSTEGAMVTVASRVQAQRKQIDRVLALFQLTREQLVQVQ          AKMRAELEYGLKKS HGLATVMLPTTYVCGLPDGTGKRFPLALDLGGTRFVLLVLRISGR          RSVRYNKIIFAIPLFIHQGTGELEFDHYVOCIADFDYMGLAGNSLPLGTFYFPCQMSI          DKGTLIQHTKGFNATDCGEGEDVYDMLREAIKRNNEFDLIVAVVHTVGTMTCCGYEDPNC          BIGLIAGTGSNNCTNEDNRNIEMVGGGGRMCINTEKCGFDNGCCIDDIRTYOTEDVDEGS          LNPGRQYKNTSCHYLGSEIVRQJLIDLRKQGLLFRGQISELRLTNGIFETRFLSQIESDR          LALLQVRRILQQLGLDSTCEDSI VVKVCGAVSRRAQQLCCGAGLAAI VERRRFDQGLEHLR          ITVGVQDGLYKLNPHFSRLQETVELAPRCDDVTMLSEGGSGKGAALITAVAKRZQAK          K</p>
<b>KELCH-LIKE 12 y homólogos</b>		
NP_067646.1 (KLHL12)	>gij11056006 ref NP_067646.1 kelch-like 12 [Homo sapiens]	<p>NGGINAFKDIINTWTHAKSILHSMNSLAKSNTLDCDVTILRVEQKDFPAHRIVLAAACSDYFCAM          FTSELSEKRPVYDIOGLTASTNEILLDFVYVTEVHTVYVENVQELPRAQLLQKGVKQAC          CEFLSQDPSNCLGIRDFAPTHNCVDLQRAAFVFSQKHFFEVVQHEETILLSQGEVERLI          KCDEIQVDSERPVFEAVIHWYKRAKRESESLPNLLOYVRMPLLPRTYTDVDAEPIIRC          SLQCRDLVDEAKKELHRLPRLASQMGQPRTRALCANEVLLVYGGFSGSQSPIDVVEKIDPK          TOENSLPSTTRRRYVAVSLRDRIYVYGGYDGRSLSVVECLDYTADEDXVYVSVARNN          VARELAGATTLGDMIVYSGGFGGSRNHTSMERYDPNIDQWENLGDQRTAREGAGLVVASGV          IYCLGGYDGLNLIINSVBEKYDEHTGHTWNTVPRATKRSAGVALANDHIYVYGGFDGTALSL          SVEAYNIRDSWTTTYSMTPTPCYVGGATVLRGRLYATAGYDGNLSLSBTECYDPIIDSRVY          VT-SWCTNRKRDAGVGVLRLEK</p>
NP_055273.2 (KLH120)	>gij40807500 ref NP_055273.2 kelch-like 20 [Homo sapiens]	<p>MEGRPARRCTNIRPGETGHDVTSRCTLGDPPKLPDGVFQPARMPYISDRHPQTLVFINLL          RKRRELCDVLVVVGAKKIYAHVYVLSACSPYFRAMFTGELAESHQTEVVIROIDERANELL          IDFAVTSQITVEEGNVQTLIPACMLQLAIEIQACCEFLRQLQLOPNSCLGIRAFADTHSCR          ELAIAIDFTQHNFEVMESEEFMLPANQLDIISSDELKLVRSERQVNAVAVNVRVYSIQ          ERRPOLFVLCVHRLPALSFKFIVGTVGSDFLAKSDECRDLVDEAKHLLLPQERFLMGQ          PRTRPKPIRCGEVAVAGWCSDAISVVERYDPCQTNENRNVASMSRRKRCVGVSVLDDL          LYAVGGHDSYLVNRYERYDPTNCHSSDVAFTSTCRTSVGVAVLGGFLYAVGGQDGVKCL          NIVERYDPEKRWIVASMSRELGVAVVGGFLYAVGGSDGTSPLNTVERYNPQENRHH          TIAFNGTRKHLGCAYVQDNIYAVGGRDQTTLELSAERYNPRTHQWSPVVAMTBRASGVGL          AVWNGOLMVGDFDGTYYLTKTIIEVDFEDANTWRLYGGMINYRRLGGGVGVIKRWTHCESHIN</p>

(continuación)

KELCH-LIKE 12 y homólogos	
NP_059111.2 (KLHL3)	>gi 166235129 ref NP_059111.1.2 kelch-like 3 [Homo sapiens]
NP_938073.1 (KLHL17)	>gi 38194229 ref NP_938073.1 kelch-like 17 [Homo sapiens]
NP_001154993. (isoforma 2 de KLHL2)	>gi 239835722 ref NP_001154993.1 kelch-like 2, isoforma 2 de Mayven [Homo sapiens]
NP_009177.3 (isoforma 1 de KLHL2)	>gi 239335720 ref NP_009177.3 kelch-like2, isoforma 1 de Mayven [Homo sapiens]

MEGSEVLSQFLIQRGDDKQRTIYVPAHAGKAFKVNNEIARSKQLLCDVNIIVAEVDEI  
EHRVYLAACSPYFCAMFTGMSKAKIIEIKVDGQTLKSLIDYIYTAIEIETVEEVQV  
LLPAASLQIMDRQNCDFLQSQHFTNCLIGIRAFADVHTCTDILQSNARAYAEHPFEM  
LGEFSLSDQVCSLISDKLTVSSSEKVEFAVSWINYEKTRLSHARKIEMRVRPLLL  
PRDYLQVVEEALIKNNNTCKDFLIEMAYHLLPLDQALLIKNPRTKPTPVSLLPKVNTV  
VGGQPKAIRSVYECYDFEEDNDQIIEELPERRCRAGVVEAGHVIYVGGENGSLRVRTVU  
YDGVKQMTSITASMOERRSTLGAARVNDLLYAVGGFDGSLASVEAYSYKTNEMFTVARN  
NTRSSVGVGVVEGKLYAVGGYDASRQCLSTVEQYNPATNEWIYVADMSTRRSAGVGVLL  
SGQLYATCGHDCPLVRKSVYVDFGNTWQVADNMCRNRNGVCAVNGLLIYVVGDDGSC  
NLASVEYINPYTDKWTLLFTNMSTGRSYAGVAVIHKSL

MQPASERPAQTQSPCHGFGGPEAPPPPPPPAPAEERTRPQARPAAPMEGAVQILS  
REGHSVAHNSKBYHDAFVMSRQRGELLCDIVLHVAKEIRAHKVVILASCSYFEMFT  
NENSESQTHTVLHDIDPQALDQVQFAYTAIEIVVGEVQTELPAASLLQLNGVRDACK  
FLSQDFSNCLIGIRGFADRAHSCDQLANAHRYVLRHFVDVAKTEEPMLLPKQVLELVS  
DSLNVPSDEEVYRAVLSWVWHDVDRQRPRALMKVRLPILSRDFLLGHVDAESLVRRHP  
DCKDILLIEMKFKHLLPEQRGLGTSRTRPRRCEGAGPVLFAVGGGSLFAIHGDCBAYDRP  
DRMRYVASKSTRARVGVAAVGNELYAVGGYDGTSLRTVESYDFVTMTQEVSMGTRAS  
CLGVAALHGLLYSAGYDASCLNSAERVDPLTGMVTSVAAMSTRRTVRYATLDGNLYAV  
GGYDSSHLATVEKYEPQNVWSVAVSNLSRRASSAGVAVLEGALYVAGGNDGTSCLASVER  
YSPRAGAVESVAPMNI RRSTHDLVAMDGRLYAVGGNDGSSSLANSIEKYNPRTRKVAASCM  
FTRASSVGVAVLELLHFPSSPTLSVSTSL

MNTEARFQILFYCTGQHQKPLDSKDDNTEKHCPTVYVNFPHMKKAFKVNNEIARSKQLLCD  
VTIYAEDEIISARHWLAACSYPHMEFTGMSSESRARVRIKEVDGNTLRLIIVYVYTAE  
TQVTEERVQVLLPAAQLLQDQVKKTCCEFLSQHFPVNCGLGIRAFADNHACTDLRKRANT  
YAEQHFADVVLSEEFNLGLIQQVCSLISDQKLTISSEKVEFAVIANVNHDRDVRQSTNAR  
LAEHVRUPLLPREYLVORVEEALVKNSSACADYLIEMKHYLLPTEQRIEMKSVTRTRUKT  
PMDLPLAVVGGQAPKAIKRSVECYDTEENHQAELFSSRRCRAGVYRAGLVAVGGFTN  
GSLRVRTVDSYDVPEDQMTSVANNRDRSTLGAAVLNGLLYAVGGFDGSLSSVEAYNIK  
SNEHFVAPNTRRSVGVVGGVGLLYAVGGYDASRQCLSTVEQYNPATNEWIYVAGGNDGT  
RRSCAGVGLNLLYAVGGHDCPLVRKSVYVDFGNTWQVADNMCRNRNGVCAVNGLLI  
YVVGDDGSCNLASVEYINPYTDKWTLLFTNMSTGRSYAGVAVIHKSL

METPPLPACTKQHQKPLDSKDDNTEKHCPTVYVNFPHMKKAFKVNNEIARSKQLLCDVTV  
AEDEIISARHWLAACSYPHMEFTGMSSESRARVRIKEVDGNTLRLIIVYVYTAELQVT  
EHRVYVLLPAAQLLQDQVKKTCCEFLSQHFPVNCGLGIRAFADNHACTDLRKRANTYARQ  
HFADVLSSEFLNLGLIQQVCSLISDQKLTISSEKVEFAVIANVNHDRDVRQSTNARLASH  
VRLPLPREYLVORVEEALVKNSSACADYLIEMKHYLLPTEQRIEMKSVTRTRUKT  
PKLAVVGGQAPKAIKRSVECYDTEENHQAELFSSRRCRAGVYRAGLVAVGGFTN  
VRTVDSYDVPEDQMTSVANNRDRSTLGAAVLNGLLYAVGGFDGSLSSVEAYNIKSNEM  
FVAPMNTRRSSVGVVGGVGLLYAVGGYDASRQCLSTVEQYNPATNEWIYVAGGNDGTSC  
AGVGLNLLYAVGGHDCPLVRKSVYVDFGNTWQVADNMCRNRNGVCAVNGLLIYVVG  
DDGSCNLASVEYINPYTDKWTLLFTNMSTGRSYAGVAVIHKSL

(continuación)

<p><b>KELCH-LIKE 12 y homólogos</b></p>	<p>NP_079286.2 (KLHL18)</p>	<p>gill55925604 ref NP_079286.2 kelch-like 18 [Homo sapiens]</p>	<p>MVEDGNEELEDLVHFSYSELFSRGIYGVMBEIRRQSKLQCDVTLAIGDHRKFSAHRIIVLAASIP YFHAFITNDMECKQDEIVNCGMDFSALEALINFAVNGNLAIDQNVQSLLAGASFLQLOQ IKDACCFTLREALKPRNCLGVRFQFAETMCAVLYDAANSFIHQHFVEYSMSSEFLAIPLED VLELVSRDELNVKSBEGVFEEAALAVVYDRQRPYLPELLSNIRLPLCRPQFLSDRVQDD DLVRCCHKRDLDVDEAKDYHLKPERRPHLPAFTRPRCCCTSIAGLIYAVGGJNSAGDSLAV VEVEDPIANCWERCRPNTTARSRVGVAVVANGLLYAI GGYDGGQLRLSTVEYVNPETDTNTRV GSMKSKRSANGTVVLDGQIYVCGGYDGNSSLSSVETYSPETDKMTVVTSMSSNRSAAGVTV FEGRIYVSGGHGDLQIFSVSEHYNHHTATMHPAAGMLAKRRCRUGAASLGSRMFVCGGYDGS GFLSIANYSVADONCLIVPMHTRRSRVSLVASCGRLYAVGGYDGGSNLSSVENYDPEID CMTFMAFNACHEGGVGVCCIPLLT I</p>
---	---------------------------------	--	---

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de diagnóstico de cirrosis biliar primaria (PBC) en un individuo que comprende:
  - a. poner en contacto una muestra de ensayo del individuo con uno o más antígenos diana, comprendiendo cada uno un epítipo de autoantígeno de hexoquinasa 1 o de un homólogo de hexoquinasa 1 de la Tabla VI; y
  - b. detectar la unión del uno o más antígenos diana a uno o más autoanticuerpos específicos para los antígenos diana en la muestra de ensayo, en el que la presencia del uno o más autoanticuerpos unidos al uno o más antígenos diana es indicativa de cirrosis biliar primaria (PBC).
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el uno o más antígenos diana se inmovilizan en un soporte sólido.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra de ensayo se pone en contacto con dos o más de los antígenos diana.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra de ensayo se pone en contacto con tres o más de los antígenos diana.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra de ensayo se pone en contacto con cuatro o más de los antígenos diana.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra de ensayo se pone en contacto con cinco de los antígenos diana.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra de ensayo son células, tejidos o fluidos corporales.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra de ensayo es sangre, plasma o suero.

20

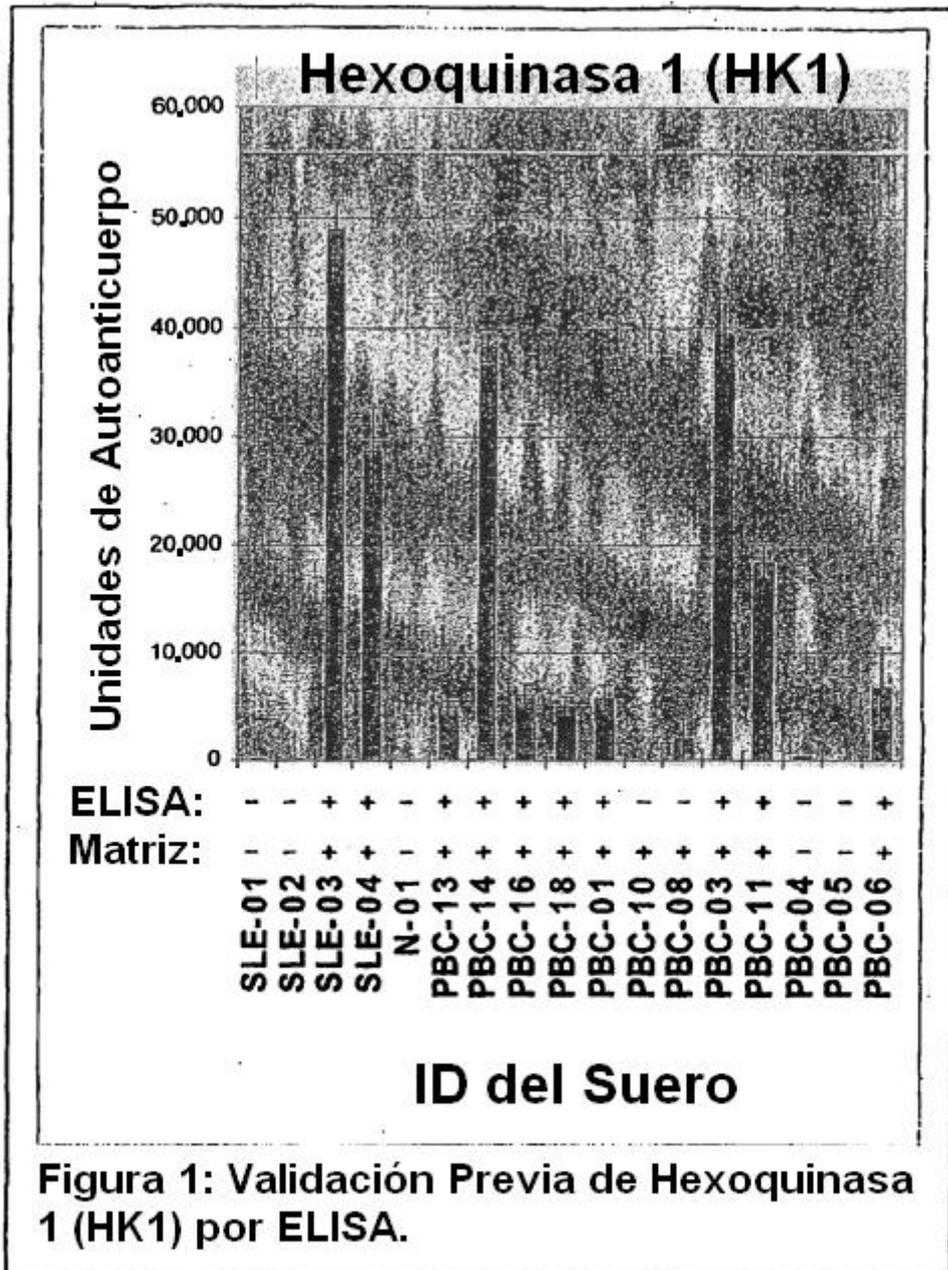
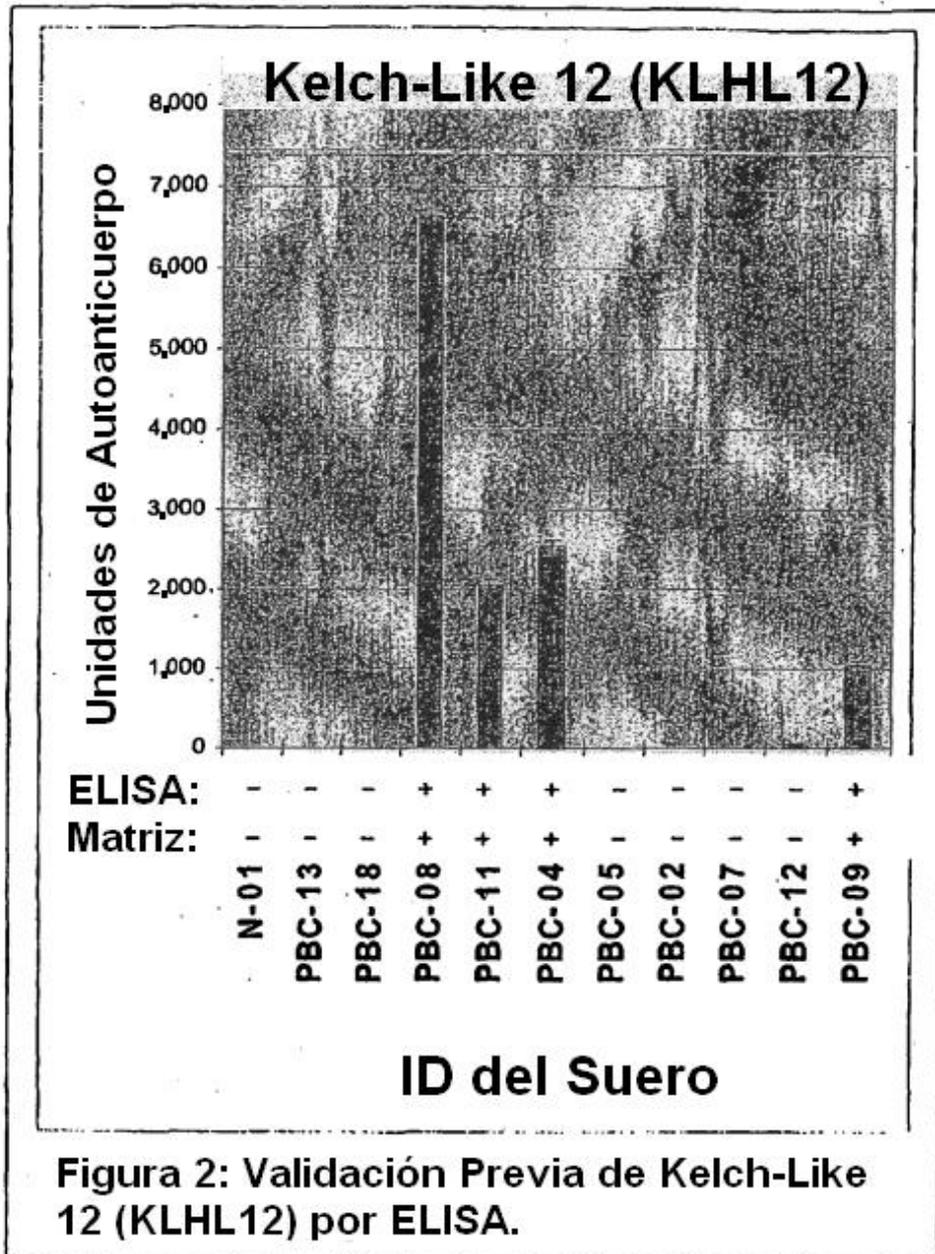
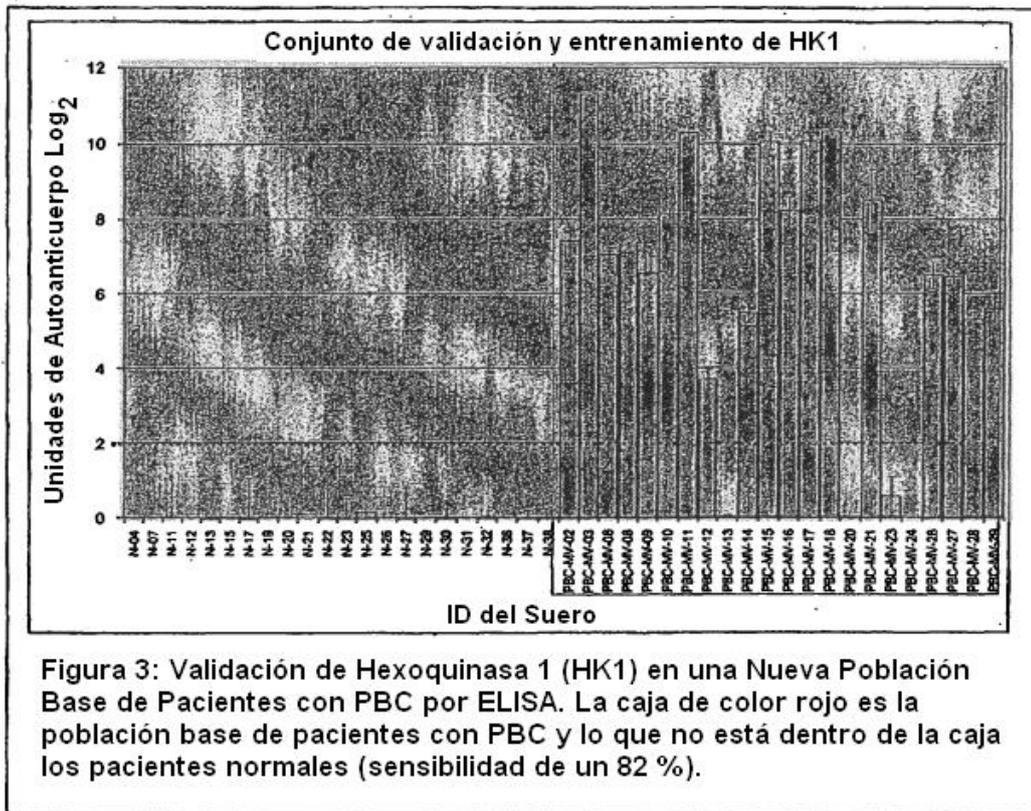
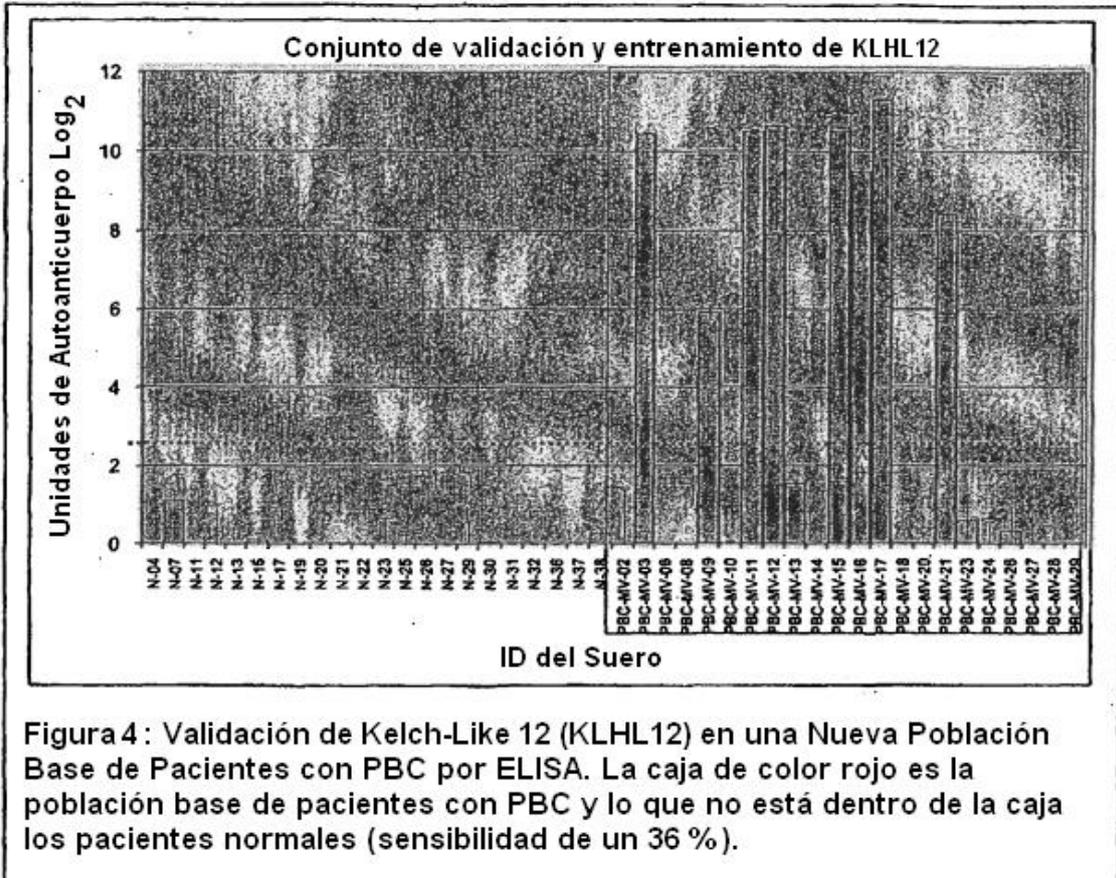


Figura 1: Validación Previa de Hexoquinasa 1 (HK1) por ELISA.







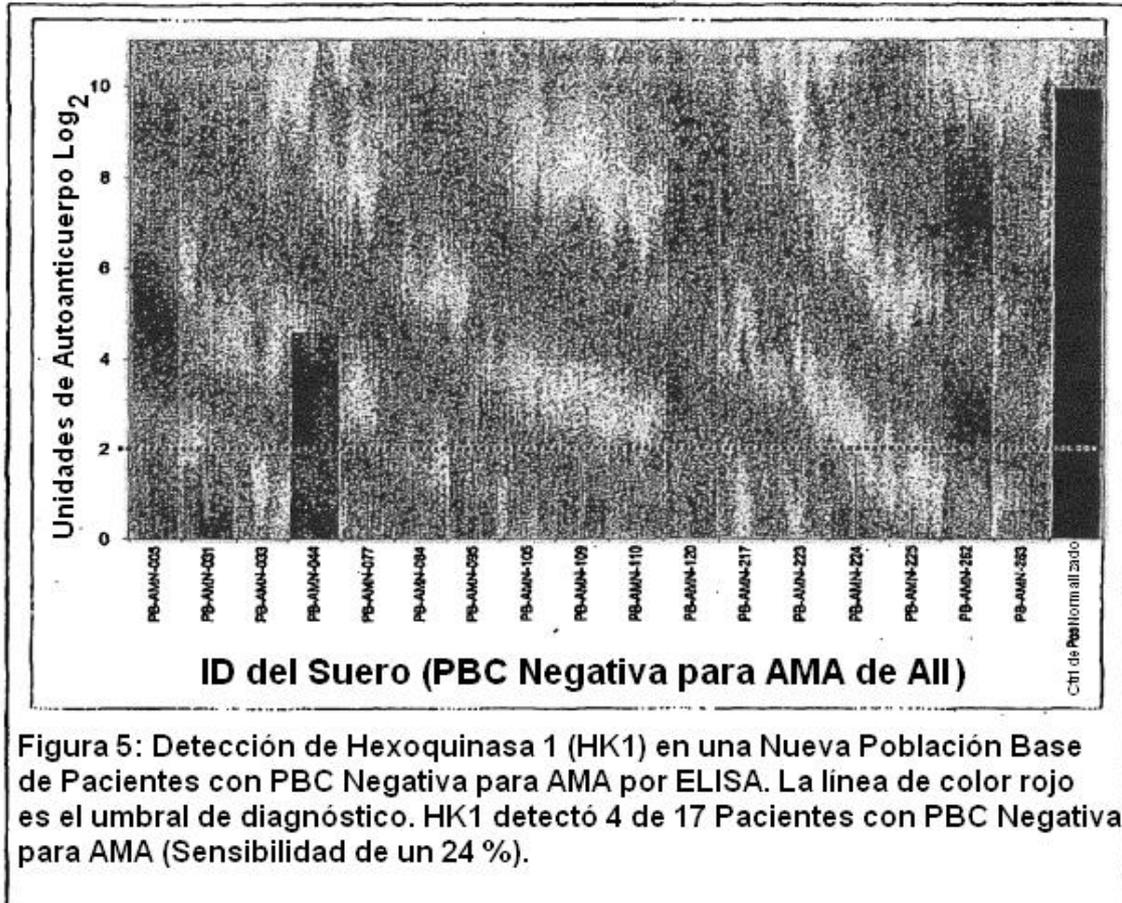
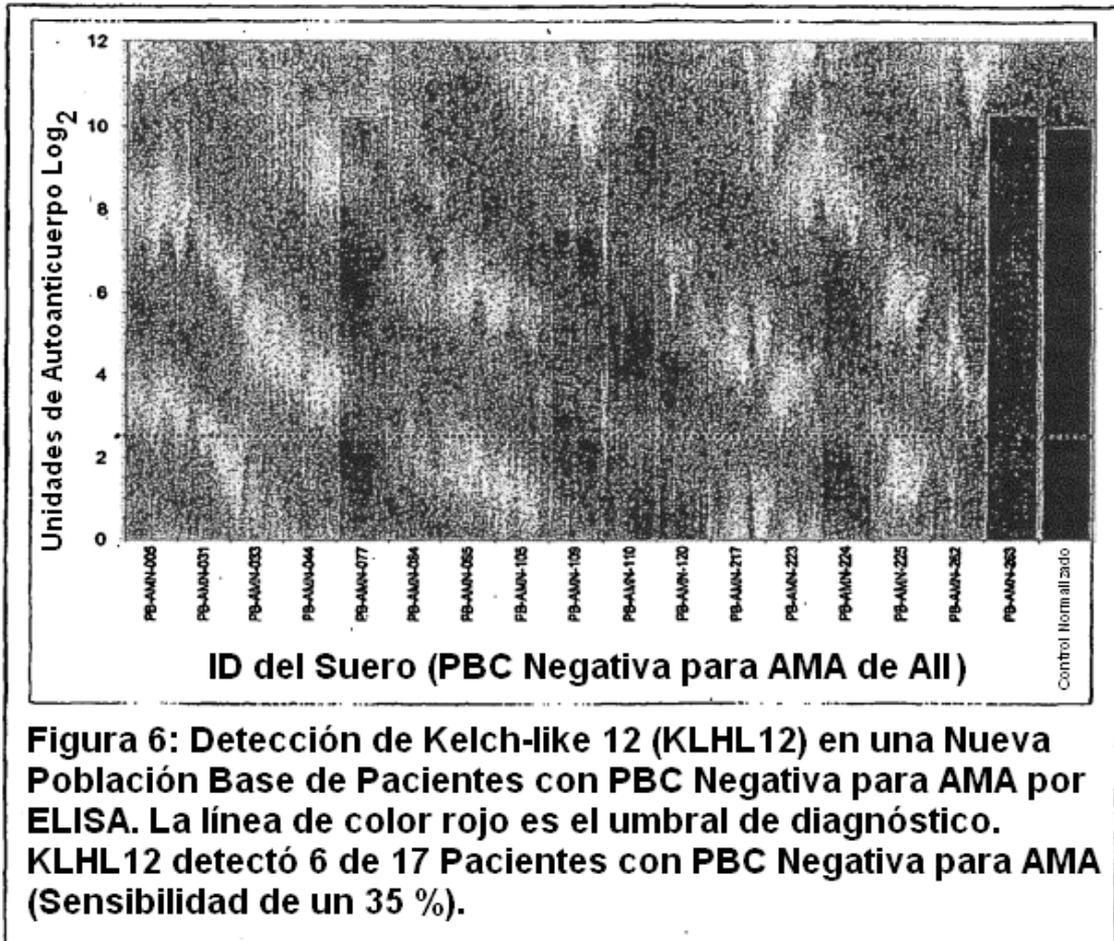
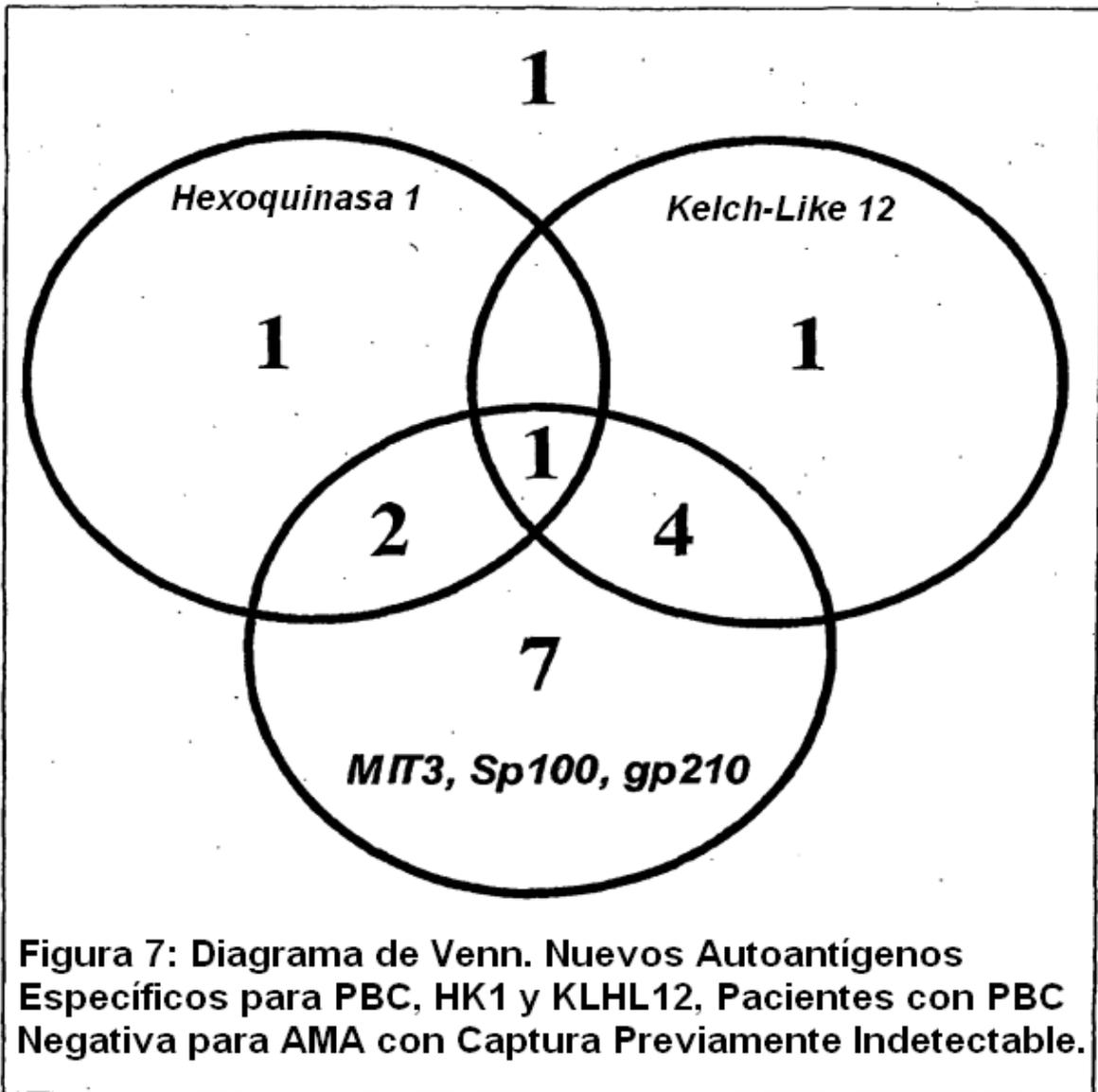
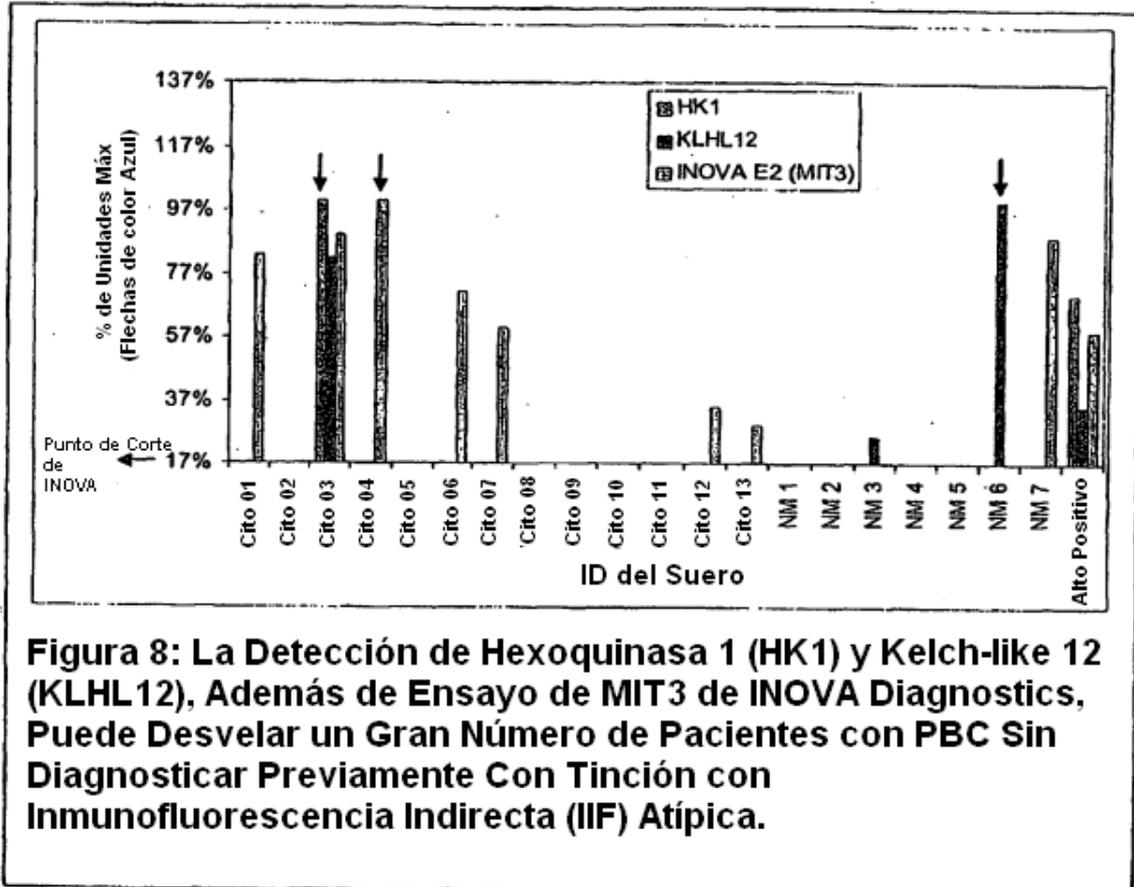
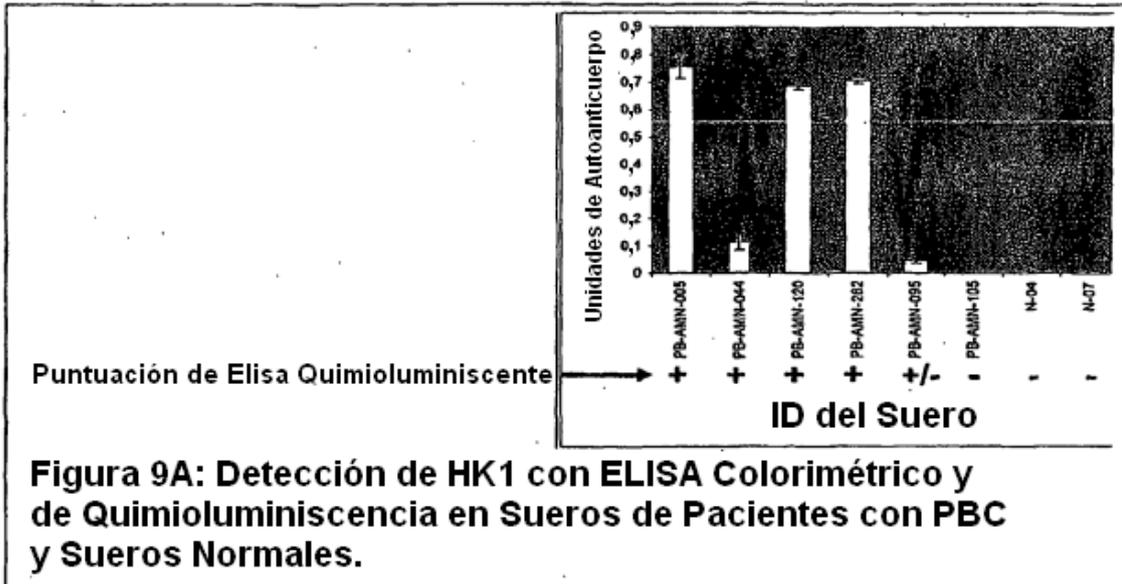


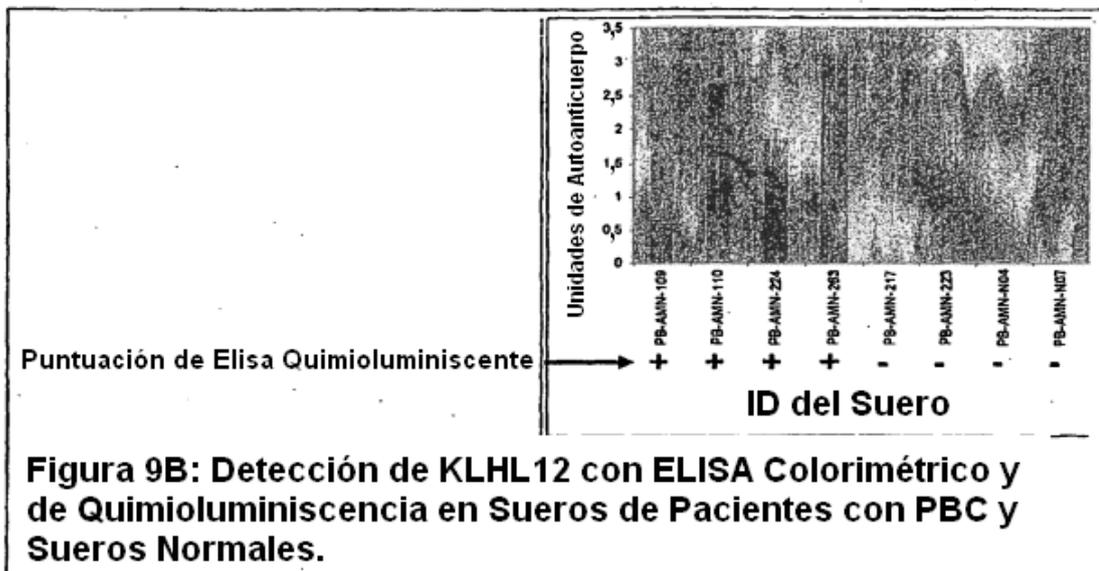
Figura 5: Detección de Hexoquinasa 1 (HK1) en una Nueva Población Base de Pacientes con PBC Negativa para AMA por ELISA. La línea de color rojo es el umbral de diagnóstico. HK1 detectó 4 de 17 Pacientes con PBC Negativa para AMA (Sensibilidad de un 24 %).

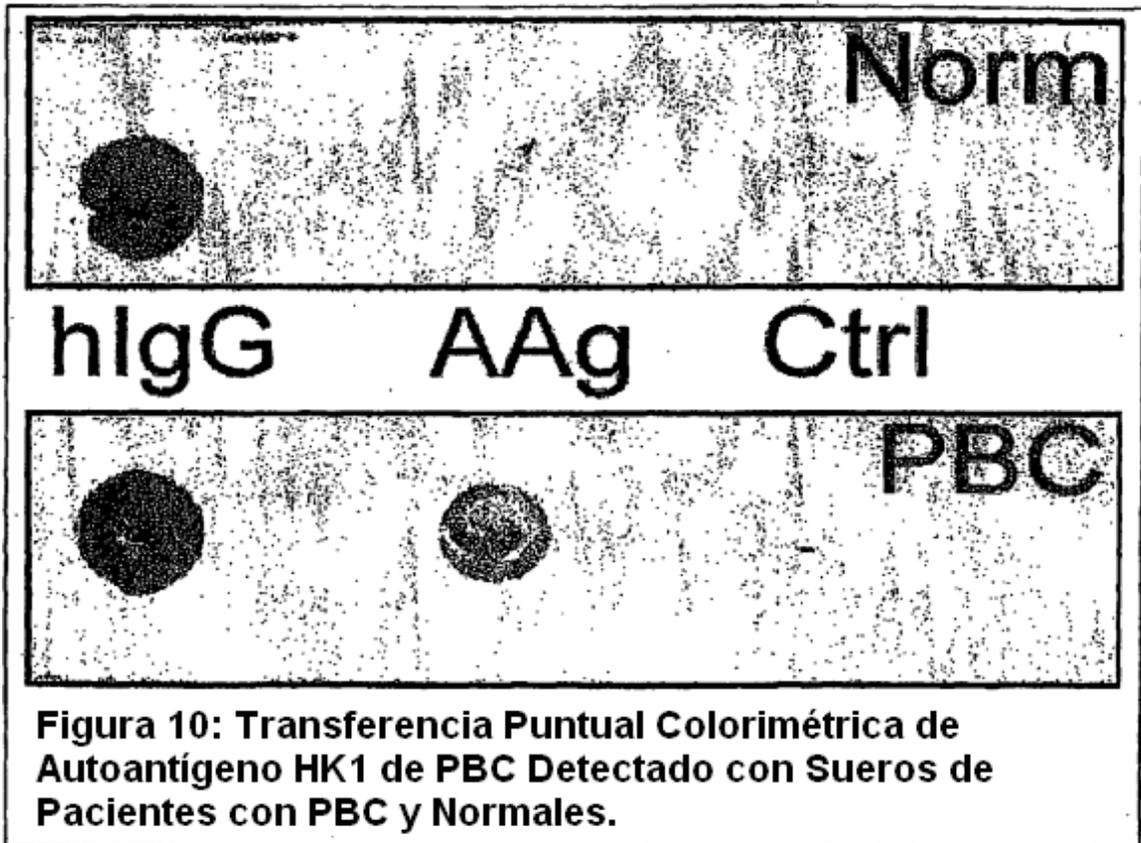


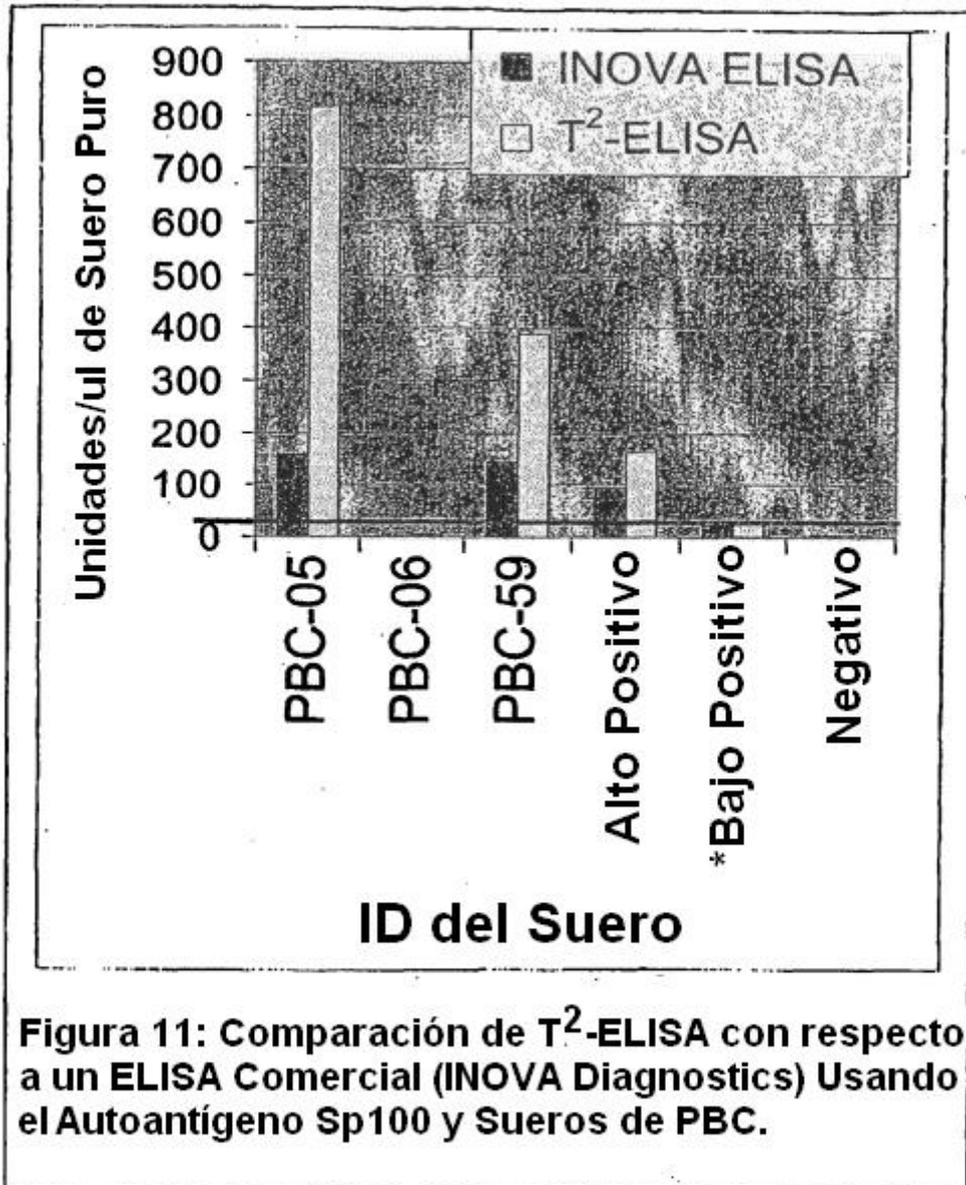


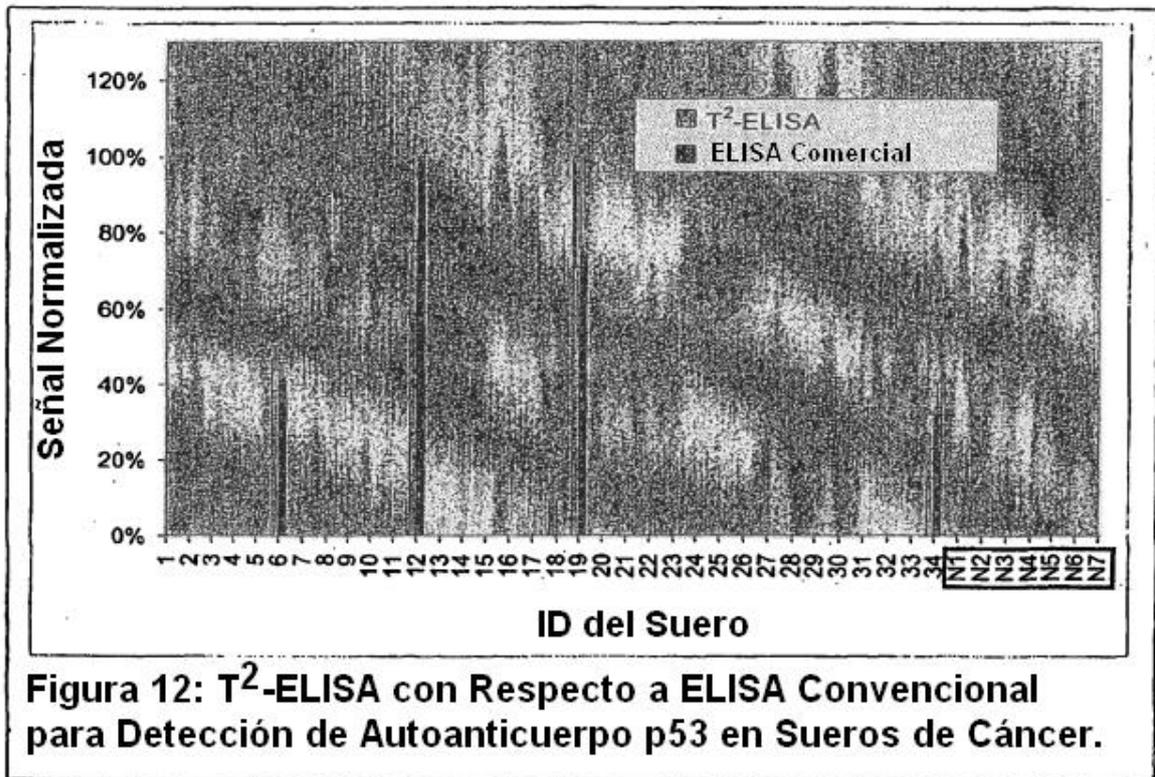












**Figura 12: T<sup>2</sup>-ELISA con Respecto a ELISA Convencional para Detección de Autoanticuerpo p53 en Sueros de Cáncer.**

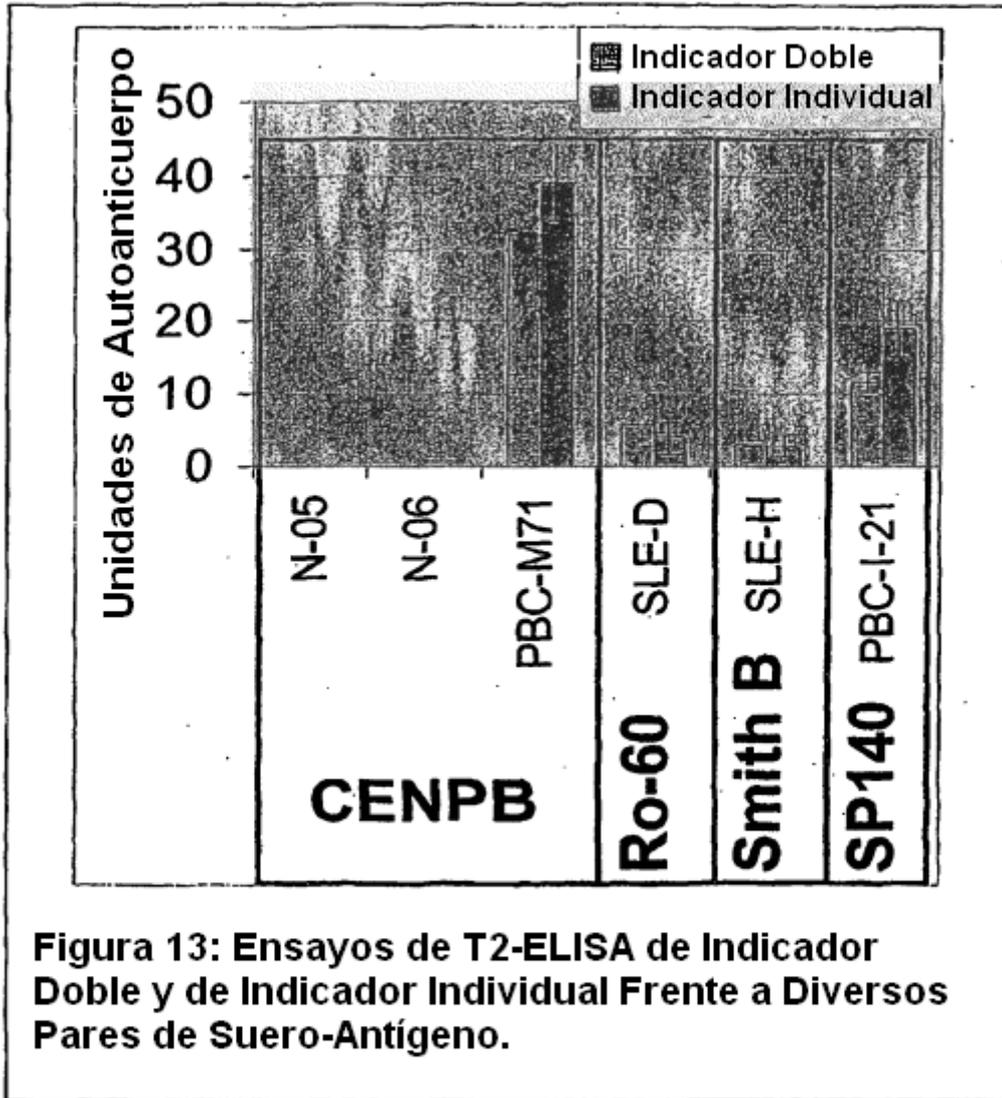


Figura 13: Ensayos de T2-ELISA de Indicador Doble y de Indicador Individual Frente a Diversos Pares de Suero-Antígeno.

