

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 790**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2011 E 11868877 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2726867**

54 Título: **Procedimiento para aumentar la especificidad de pruebas de diagnóstico para enfermedades autoinmunitarias**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.06.2016

73 Titular/es:

INOVA DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)
9900 Old Grove Road
San Diego, CA 92131, US

72 Inventor/es:

MAHLER, MICHAEL

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 574 790 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

Procedimiento para aumentar la especificidad de pruebas de diagnóstico para enfermedades autoinmunitarias

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, a un procedimiento para aumentar la especificidad de pruebas basadas en anticuerpos para ayudar en el diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias. Más específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento para aumentar la especificidad de dicha prueba diagnóstica poniendo en contacto una muestra objeto con un antígeno de bloqueo antes de probar que es capaz de unirse a cualquier anticuerpo de interferencia presente en la muestra.

Antecedentes de la invención

10 En la técnica se conoce la detección de anticuerpos en muestras biológicas para ayudar en el diagnóstico de enfermedades, una infección o una reacción inmunitaria. Para algunas indicaciones, tales como enfermedades autoinmunitarias, estos anticuerpos son autoanticuerpos que reconocen y forman complejos con "antígenos propios", moléculas dentro del propio cuerpo de una persona que son capaces de estimular autoinmunidad. La enfermedad autoinmunitaria surge cuando el cuerpo inicia una respuesta inmunitaria contra sus propios tejidos y órganos.

15 Cuando esto ocurre, el sistema inmunitario produce anticuerpos, también conocidos como autoanticuerpos que se dirigen y atacan las células o tejidos del cuerpo. Esta reacción se denomina respuesta autoinmunitaria y se caracteriza más comúnmente por una inflamación y un daño tisular. Por lo tanto, las enfermedades autoinmunitarias son un gran riesgo de salud a nivel mundial. No se conoce el número actual de individuos que padecen una enfermedad autoinmunitaria debido a la falta de estadísticas registradas. Sin embargo, se espera que este número

20 aumente dramáticamente en la próxima década debido a varios factores, incluyendo el aumento de la contaminación ambiental. En particular, la contaminación ambiental, tal como la radiación ultravioleta, el ozono, los disolventes orgánicos y las partículas ultrafinas se han relacionado con la inducción y/o exacerbación de las enfermedades autoinmunitarias. Hoy en día, existen más de ochenta enfermedades causadas por autoinmunidad, y varias otras se cree que son el resultado de esta condición. Aproximadamente el 5-7 % de los americanos están afectados por estas enfermedades y más del 75 % de estos son mujeres. De hecho, es una de las diez causas principales de muerte en mujeres en todos los grupos de edad hasta los 65 años. Por comparación, aproximadamente 23,5 millones de personas en los Estados Unidos padecen una enfermedad autoinmunitaria comparado con los 9,0 millones que tienen cáncer.

30 Algunas enfermedades autoinmunitarias son específicas de un tejido u órgano, mientras que otras afectan varios órganos del cuerpo humano. Las enfermedades de esta última categoría se denominan a menudo "enfermedades reumáticas autoinmunitarias sistémicas" ("ERAS", *systemic autoimmune rheumatic diseases*), y los síntomas pueden variar de un paciente a otro, produciéndose daño tisular e inflamación en múltiples sitios y órganos sin relación con su composición antigénica. Algunas de las ERAS más comunes incluyen artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (lupus), enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis sistémica, polimiositis, dermatomiositis,

35 síndrome de Sjögren y similares. Generalmente se cree que las enfermedades autoinmunitarias están influenciadas por múltiples factores, siendo algunos de los factores que contribuyen la disposición genética, factores del huésped (tales como defectos de los linfocitos T y la estimulación policlonal de linfocitos B que son resistentes a los controles), factores ambientales (tales como virus, agentes químicos y ciertas infecciones microbianas) y mecanismos dirigidos por antígenos (tales como antígenos secuestrados o antígenos exógenos de reacción cruzada).

40 Una característica común de muchas ERAS es la presencia de uno o más tipos de anticuerpos antinucleares ("AAN") en los fluidos corporales de los pacientes afectados. Generalmente, los AAN son autoanticuerpos dirigidos contra antígenos en el núcleo de las propias células de la persona. Por lo tanto, con el tiempo, se han formulado diversos ensayos y exámenes de diagnóstico de AAN, para la detección de los AAN, tales como los ensayos de inmunofluorescencia indirecta ("IFI") y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas ("ELISA").

45

El ensayo de IFI es una de las pruebas de rutina más comúnmente usadas para la detección de los AAN y está recomendado por el Colegio Americano de Reumatología ("CAR"). Normalmente, un suero de un paciente se diluye en una solución tampón y se deja reaccionar con células que se han fijado en un portaobjetos. Si en el suero del paciente hay anticuerpos que son inmunoreactivos con los componentes del antígeno asociados con la célula, se unirán a las células y formarán un complejo antígeno-anticuerpo. Tras un lavado para retirar cualquier material sin unir, se detecta la presencia de complejos antígeno-anticuerpo usando un anticuerpo anti-ser humano marcado con un resto fluorescente. Después se detecta la presencia de una señal fluorescente visualizando las células en un microscopio o más recientemente con sistemas de imagen digital.

50

El procedimiento de IFI no es específico para ciertas enfermedades autoinmunitarias debido a que se detectan diversas especificidades de autoanticuerpos que tienen asociaciones clínicas diferentes. En varios casos significativos, múltiples patrones de fluorescencia solapados pueden complicar sustancialmente la interpretación del patrón. Por lo tanto, los ensayos específicos de confirmación son obligatorios para identificar las especificidades del autoanticuerpo presentes en el espécimen del paciente. Más específicamente, incluso si se ve que un patrón es

55

sugestivo de una enfermedad autoinmunitaria específica, es necesario una extensa prueba confirmatoria con antígenos purificados tales como Sm, Scl-70, Ro, La, RNP y ADN de doble hélice ("ADNdh"), usando ensayos tales como inmunoensayos de enzimas ("IEE"), inmunodifusión o hemaglutinación antes de que uno pueda utilizar los resultados de la prueba para ayudar en el diagnóstico de la enfermedad. Además, puede suceder la ocultación de los patrones de fluorescencia, especialmente si la muestra no se titula apropiadamente. Estudios recientes han mostrado que la IFI en las líneas celulares ("HEp-2") epiteliales del ser humano tiene una tasa de falsos positivos de aproximadamente el 20 %. Específicamente, cuando las pruebas de diagnóstico de AAN producen un resultado de falso positivo, los médicos normalmente pedirán una serie de pruebas confirmatorias que no solo son costosas sino que también pueden conducir a un diagnóstico erróneo. Por consiguiente, uno de los inconvenientes para usar el procedimiento de IFI, para la detección de AAN, es que genera un gran número de falsos positivos, que pueden conducir a un diagnóstico erróneo de los pacientes que padecen una enfermedad autoinmunitaria o condiciones que simulan una enfermedad autoinmunitaria, y posteriormente un tratamiento innecesario o un tratamiento insuficiente.

Además, los resultados pueden ser difíciles de interpretar y como tal, la utilización de los resultados con anticuerpos específicos normalmente es menor que la óptima. Además, el retraso entre la generación de un examen positivo y la generación de los resultados con anticuerpos específicos puede ser difícil tanto para el paciente como para el médico, dado el valor predictivo positivo bajo del resultado inicial. En particular, cuando se reciben los resultados con anticuerpos específicos, pueden ser muy sugerentes en algunos casos (por ejemplo, anticuerpo anti-Sc1-70 positivo, que indica una alta probabilidad de esclerosis sistémica) o pueden no ser muy útiles (por ejemplo, solo Ro52 positivo, asociación clínica todavía desconocida). Como tal, una prueba de AAN positiva puede producir una parte considerable de individuos con AAN positivos con evidencias no confirmadas de enfermedad autoinmunitaria. Esto se vuelve aún más crucial en vista de la percepción de que los autoanticuerpos pueden preceder a la aparición clínica de la enfermedad autoinmunitaria durante muchos años.

Por consiguiente, la IFI es un procedimiento diagnóstico con limitaciones obvias que no genera un registro permanente, supone múltiples ensayos, que consume mucho tiempo, es laborioso y caro (cuando se consideran los costes de personal y de seguimiento de las pruebas), requiere experiencia considerable en la interpretación de los resultados y puede conducir a errores de diagnóstico de la enfermedad autoinmunitaria.

En los últimos años, se ha informado de que aproximadamente el 20 % de los individuos sanos contenían AAN, en los que los anticuerpos anti moteado fino denso 70 ("anti-DFS70") representan una causa importante de los resultados de falso positivo. Los anticuerpos anti-DFS70 se han identificado inicialmente como los AAN de un paciente con cistitis intersticial, y estos autoanticuerpos se han asociado después con otras condiciones diversas de enfermedad tales como dermatitis atópica (Ochs y col., 1994 J Urol; 151:587-592). Ochs y col. han descrito el patrón de tinción de IFI por anticuerpos anti-DFS70 como un patrón de tinción inmunohistoquímico característico en células HEp-2 que consiste en un DFS (moteado fino denso, del inglés *dense fine speckled*) distribuido en el nucleoplasma en células en interfase y con tinción generalizada acentuada de cromosomas condensados en las células mitóticas. Aunque se ha reconocido una proteína de 70 kDa mediante inmunotransferencia y el antígeno se ha denominado inicialmente DFS70, el principal autoantígeno diana se ha identificado posteriormente como el factor de crecimiento derivado del epitelio del cristalino (LEDGF), también denominado coactivador de la transcripción de ADN p75. Se cree que esta proteína tiene varias funciones fisiológicas, incluyendo servir como cofactor para la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana a través de una interacción con la integrasa viral, y también se expresa altamente en el tejido tumoral de la próstata.

Desde su primera caracterización, se han encontrado anticuerpos anti-DFS70 en el suero de pacientes con una variedad de condiciones inflamatorias crónicas, pacientes con cáncer e incluso frecuentemente en individuos sanos. En 2005, Dellavance y col. (Dellavance y col. 2005 J Rheumatol 32(11):2144-9) han evaluado más de 10.000 muestras de AAN positivas por IFI y después inmunotransferencia, informando que los anticuerpos anti-DFS70 eran comunes entre los individuos con AAN positivo sin evidencia de ERAS, y que entre los pacientes autoinmunitarios con este autoanticuerpo, más del 50 % tenían evidencias de tiroiditis autoinmunitaria. La prevalencia más alta de anticuerpos anti-DFS70 se ha informado en pacientes con síndrome de Vogt-Harada (66,7 %) y dermatitis atópica (30 %), seguido de individuos sanos (~ 10 %), mientras que su prevalencia en las ERAS es significativamente menor (~ 2-3 %). Además, cuando se considera el pronóstico y el resultado a largo plazo de los individuos que tienen anticuerpos anti-DFS70, se ha informado recientemente que ninguno de los 40 individuos sanos con anti-DFS70 positivo desarrollaron una enfermedad autoinmunitaria en un intervalo medio de 4 años. Por lo tanto, se ha sugerido que los anticuerpos anti-DFS pueden utilizarse como un biomarcador para descartar la ERAS.

Sin embargo, la posible importancia clínica de los autoanticuerpos para DFS70/LEDGF también se ha cuestionado debido a estudios en conflicto. En 2004, Watanabe y col. (Watanabe y col. 2004 Arthritis Rheum 50:892-900) han mostrado que los síntomas asociados con dermatitis atópica estaban presentes entre los sujetos con anti-DFS70 positivo. Adicionalmente por el contrario, Yamada y col. (Yamada y col. 2001 Immunol Lett 78:161-8) han usado el ensayo ELISA para mostrar una alta prevalencia de anticuerpos para DFS70 en pacientes con síndrome de Vogt-Harada, un trastorno autoinmunitario e inflamatorio sistémico. Otros estudios también han demostrado que los autoanticuerpos para DFS70/LEDGF aparecen en una variedad de condiciones inflamatorias crónicas. Por consiguiente, la importancia clínica de las pruebas para los autoanticuerpos anti-DFS70 sigue siendo un punto de debate debido a su asociación y relevancia para el diagnóstico de la enfermedad autoinmunitaria. Sin embargo, se ha logrado un consenso de que los anticuerpos anti-DFS70 son significativamente menos frecuentes en pacientes

con ERAS en comparación con los individuos sanos. Por lo tanto, los anticuerpos anti-DFS70 reducen la especificidad y por lo tanto el valor predictivo positivo de la prueba de AAN.

- 5 Por lo tanto, existe una necesidad en el campo para un procedimiento que aumente la especificidad de las pruebas basadas en anticuerpos para las enfermedades autoinmunitarias que reduzca la frecuencia de falsos positivos en la detección de AAN, el alto coste, las pruebas de confirmación innecesarias y los errores de diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra la secuencia de aminoácidos deducida del antígeno del DFS70 de longitud completa (SEQ ID NO: 1).

- 10 La FIG. 2 muestra un gráfico que representa la reactividad de los anti-DFS70 en pacientes autoinmunitarios y controles sanos tanto antes como después de la absorción de autoanticuerpos anti-DFS70. Antes de la absorción de los anticuerpos anti-DFS70 (barras negras) 10/11 de las muestras de donantes sanos fueron positivas. Después de la absorción (barras blancas), solamente 2/10 siguieron siendo positivas.

Breve descripción de las secuencias

- 15 La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos del antígeno del DFS70 de longitud completa que consiste en 530 aminoácidos.

La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de un fragmento antigénico derivado del DFS70 correspondiente a los residuos de aminoácido 1-326 del antígeno del DFS70 de longitud completa.

- 20 La SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de un fragmento antigénico derivado del DFS70 correspondiente a los residuos de aminoácido 323-530 del antígeno del DFS70 de longitud completa.

La SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de un fragmento antigénico derivado del DFS70 correspondiente a los residuos de aminoácido 375-530 del antígeno del DFS70 de longitud completa.

La SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de un fragmento antigénico derivado del DFS70 correspondiente a los residuos de aminoácido 323-375 del antígeno del DFS70 de longitud completa.

- 25 La SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de un fragmento antigénico derivado del DFS70 correspondiente a los residuos de aminoácido 323-407 del antígeno del DFS70 de longitud completa.

La SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de un fragmento antigénico derivado del DFS70 correspondiente a los residuos de aminoácido 349-435 del antígeno del DFS70 de longitud completa.

- 30 La SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de un fragmento antigénico derivado del DFS70 correspondiente a los residuos de aminoácido 349-450 del antígeno del DFS70 de longitud completa.

La SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos de un fragmento antigénico derivado del DFS70 correspondiente a los residuos de aminoácido 349-464 del antígeno del DFS70 de longitud completa.

Sumario de la invención

- 35 Se ofrece el siguiente sumario simplificado para proporcionar un entendimiento básico de algunos aspectos de la materia objeto reivindicada. Este sumario no es una visión amplia, y no está destinado a identificar elementos claves/críticos o delimitar el alcance de la materia objeto reivindicada. Su fin es presentar algunos conceptos de una forma simplificada como preludio a la descripción más detallada que se presenta más adelante.

- 40 En una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para aumentar la especificidad de un ensayo de enfermedad autoinmunitaria basado en anticuerpos comprendiendo las etapas de: proporcionar una muestra de suero o plasma de un paciente; poner en contacto la muestra de suero o plasma con un antígeno derivado del DFS70 para formar un complejo entre el antígeno derivado del DFS70 y los anticuerpos anti-DFS70 que pueden estar presentes en la muestra; hacer reaccionar la muestra con una diana de la enfermedad autoinmunitaria; y detectar los anticuerpos para la diana de la enfermedad autoinmunitaria.

- 45 En algunas realizaciones ejemplares, la etapa de poner en contacto la muestra de suero o plasma con un antígeno derivado del DFS70 para formar un complejo entre el antígeno derivado del DFS70 y los anticuerpos anti-DFS70 que pueden estar presentes en la muestra bloquea la aparición de los autoanticuerpos anti-DFS70 en los resultados del ensayo de enfermedad autoinmunitaria basado en anticuerpos.

- 50 En realizaciones adicionales de la presente invención, la etapa de poner en contacto la muestra de suero o plasma con un antígeno derivado del DFS70 para formar un complejo entre el antígeno derivado del DFS70 y los anticuerpos anti-DFS70 que pueden estar presentes en la muestra proporciona una identificación mejorada de otros

anticuerpos en la muestra objeto.

En otra realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para aumentar la especificidad de un ensayo de enfermedad autoinmunitaria basado en anticuerpos, en el que el ensayo de enfermedad autoinmunitaria basado en anticuerpos es una prueba con anticuerpos antinucleares (AAN). En otras realizaciones ejemplares, el ensayo de enfermedad autoinmunitaria basado en anticuerpos se selecciona del grupo que consiste en un ensayo inmunoabsorbente fluorescente (EIF), un ensayo inmunoabsorbente quimioluminiscente (EIQ), un radioinmunoensayo (RIE), un inmunoensayo enzimático multiplicado, un radioinmunoensayo en fase sólida (RIEFS) y un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

En diversos aspectos de la presente invención, el antígeno derivado del DFS70 usado en los procedimientos como se describe en el presente documento es la SEQ ID NO: 1. En realizaciones alternativas, el antígeno derivado del DFS70 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9. En otras realizaciones ejemplares, el antígeno derivado del DFS70 es un fragmento de la secuencia de aminoácidos del DFS70 (SEQ ID NO: 1). Además, en al menos una realización de la presente invención, el antígeno derivado del DFS70 puede prepararse diluyendo, en solución, un antígeno derivado del DFS70 antes de poner en contacto la muestra de suero o plasma con un antígeno derivado del DFS70.

En realizaciones adicionales de la presente invención, la diana de la enfermedad autoinmunitaria es una molécula, o una combinación de moléculas, asociadas con una enfermedad autoinmunitaria sistémica. En otras realizaciones, la diana de la enfermedad autoinmunitaria es una molécula, o una combinación de moléculas, asociadas con una enfermedad del tejido conectivo. En diversos aspectos de la presente invención, la enfermedad del tejido conectivo se selecciona del grupo que consiste en, pero sin limitación: lupus eritematoso sistémico (LES), polimiositis (PM), esclerosis sistémica y enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC).

Diversos procedimientos de detección ejemplares para la detección de anticuerpos para la diana de la enfermedad autoinmunitaria incluyen usar un marcador seleccionado del grupo que consiste en un agente fluorescente, una enzima, un quimioluminiscente, un fotosensibilizador y partículas suspendibles.

Otros aspectos de la presente invención se encuentran durante toda la memoria descriptiva.

Descripción detallada de la invención

La presente invención generalmente se refiere a un procedimiento para aumentar la especificidad de una prueba diagnóstica para ayudar en el diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias. Más específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento para aumentar la especificidad de dicha prueba diagnóstica, por ejemplo una prueba de AAN, poniendo en contacto una muestra objeto con un antígeno de bloqueo específico antes de probar que es capaz de unirse a los autoanticuerpos de interferencia presentes en la muestra.

Se ha mostrado que la detección de anticuerpos anti-DFS70 en las muestras objeto produce un número significativo de falsos positivos cuando se llevan a cabo pruebas de AAN, debido a que algunos individuos sanos e individuos con alteraciones distintas a las ERAS tienen anticuerpos anti-DFS70. Además, los anticuerpos anti-DFS70 generan patrones de fluorescencia de DFS70 que ocultan los resultados de las pruebas de inmunofluorescencia, haciendo más difícil identificar los patrones de fluorescencia pertenecientes a otros anticuerpos detectados. Por estas razones, la contribución de los anticuerpos anti-DFS70 a un resultado positivo de la prueba de AAN puede conducir a un potencial error de diagnóstico a no ser que se lleve a cabo una prueba exhaustiva de confirmación.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento para aumentar la especificidad de las pruebas diagnósticas para ayudar en el diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias, tales como pruebas de AAN, en las que la pre-incubación con un antígeno derivado del DFS70 permite al antígeno derivado del DFS70 unirse a cualquiera de los anticuerpos anti-DFS70 presentes en una muestra objeto, previniendo de este modo la detección de anticuerpos anti-DFS70. Por lo tanto, la pre-incubación con un antígeno derivado del DFS70 evita que los anticuerpos anti-DFS70 se detecten, lo que aumenta la especificidad de una prueba de inmunodiagnóstico al reducir el número de falsos positivos...

Más específicamente, la presente invención proporciona, en un aspecto, un procedimiento para aumentar la especificidad de una prueba de AAN. El procedimiento incluye: preparar una muestra objeto de un paciente; poner en contacto la muestra objeto del sujeto con un antígeno derivado del DFS70, o antígeno de bloqueo, para unir cualquiera de los anticuerpos anti-DFS70 de interferencia que pueden estar presentes en la muestra objeto; hacer reaccionar la muestra objeto con una diana de la enfermedad autoinmunitaria; y detectar la unión de uno o más anticuerpos en la muestra objeto para una diana de la enfermedad autoinmunitaria en la muestra objeto. El antígeno de bloqueo puede ser el antígeno del DFS70 de longitud completa (SEQ ID NO: 1) o un fragmento del mismo que incluye un epitopo, tal como cualquiera de los antígenos derivados del DFS70 ejemplares ejemplificados en las SEC NOS: 2-9.

Como se ha discutido, hay varias ventajas al usar los procedimientos descritos en la presente invención. La ocurrencia de falsos positivos se reduce significativamente, en algunos casos una reducción de hasta el 50 % de los

anticuerpos no asociados a enfermedad. Adicionalmente, otra ventaja es el desenmascaramiento de los patrones clínicamente relevantes asociados con las enfermedades autoinmunitarias sistémicas que se han ocultado por el patrón de fluorescencia del DFS70. Específicamente, cuando un antígeno de bloqueo, ejemplificado por cualquier antígeno derivado del DFS70, se pone en contacto con una muestra objeto, el antígeno de bloqueo se une a cualquiera de los autoanticuerpos anti-DFS70 presentes en la muestra objeto. Debido a que los autoanticuerpos anti-DFS70 se unen al antígeno derivado del DFS70, los autoanticuerpos anti-DFS70 son incapaces de unirse posteriormente a una diana de la enfermedad autoinmunitaria deseada. Por lo tanto, usando un antígeno de bloqueo, la especificidad y precisión de una prueba de inmunodiagnóstico puede aumentarse significativamente de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento.

10 Definiciones

En la descripción que sigue, se utilizan extensamente varios términos usados en el campo de la biología molecular, inmunología y medicina. Con el fin de proporcionar una comprensión clara y consistente de la memoria descriptiva y reivindicaciones, incluyendo el alcance que ha de darse a tales términos, se proporcionan las siguientes diferenciaciones no limitativas.

15 Cuando los términos “uno”, “un”, o “una” se usan en esta divulgación, significan “al menos uno” o “uno o más”, a menos que se indique lo contrario.

La expresión “enfermedad autoinmunitaria” se refiere a una enfermedad o a un trastorno que surge de las reacciones inmunitarias dirigidas contra los propios tejidos y órganos de un individuo o la manifestación de los mismos o la condición resultante de los mismos. Tal como se usa en el presente documento, la expresión “enfermedad autoinmunitaria” incluye el cáncer y otros estados de enfermedad en los que los anticuerpos que se dirigen hacia los propios tejidos no están necesariamente implicados en la condición de enfermedad pero aún son importantes en los diagnósticos. Adicionalmente, en una realización, se refiere a una condición que resulta de, o se agrava por, la producción de autoanticuerpos por linfocitos B de anticuerpos que son reactivos con los tejidos y los antígenos normales del cuerpo. En otras realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria es la que implica la secreción de un autoanticuerpo que es específico para un epítipo de un antígeno propio (por ejemplo un antígeno nuclear).

La expresión “enfermedad autoinmunitaria sistémica” se refiere a una enfermedad, trastorno o una combinación de síntomas causados por reacciones autoinmunitarias que afectan a más de un órgano. Por consiguiente, la expresión “enfermedad autoinmunitaria sistémica” incluye, pero sin limitación, nefritis anti-MBG (enfermedad de Goodpasture), granulomatosis con poliangeítis (GPA), poliangeítis microscópica (PAM), lupus eritematoso sistémico (LES), polimiositis (PM) o enfermedad celíaca.

La expresión “enfermedad del tejido conectivo” se refiere a una enfermedad, trastorno o una combinación de síntomas causados por reacciones autoinmunitarias que afectan al tejido conectivo del cuerpo. Por consiguiente, la expresión “enfermedad del tejido conectivo” incluye, pero sin limitación, lupus eritematoso sistémico (LES), polimiositis (PM), esclerosis sistémica o enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC).

35 El término “anticuerpo” se refiere a una molécula de inmunoglobulina que es capaz de unirse a un epítipo o un determinante antigénico. El término “anticuerpo” incluye los anticuerpos completos y los fragmentos de unión al antígeno de los mismos, incluyendo anticuerpos de cadena simple. Por consiguiente, el término “anticuerpo” incluye un anticuerpo de unión a un antígeno de un ser humano y fragmentos de anticuerpo, incluyendo, pero sin limitación, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs de cadena simple (Fvcs), anticuerpos de cadena simple, Fvs unidos por disulfuro (Fvsd) y fragmentos que comprenden un dominio V_L o V_H. Los anticuerpos pueden ser de cualquier origen animal tales como por ejemplo mamíferos, incluyendo ser humano, murino, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo y similares.

45 El término “antígeno” se refiere a una molécula que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria. El término “antígeno” incluye cualquier molécula que es capaz de estar unida a un anticuerpo. Además, el término “antígeno” puede referirse a un antígeno proteínico o no proteínico. El antígeno puede ser una proteína entera o una parte de la misma.

50 La frase “sustitución de un aminoácido” como se usa en el presente documento se refiere al reemplazo o conversión de un residuo de aminoácido en una secuencia con otra molécula. La molécula puede ser un aminoácido natural o no natural, una molécula orgánica u otro resto químico. En el reemplazo, un residuo de aminoácido en una secuencia que se sintetiza puede sustituirse con otro residuo de aminoácido o molécula. Por ejemplo, reemplazando leucina con isoleucina, que sería una sustitución conservadora, en la que un residuo de aminoácido hidrófobo se sustituye con otro residuo de aminoácido hidrófobo. En la conversión, un residuo de aminoácido en una secuencia se convierte en otro aminoácido. Por ejemplo, la glutamina puede convertirse mediante desaminación en ácido glutámico, o la arginina convertirse mediante una deiminasa en citrulina.

55 El término “péptido” como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de dos o más residuos aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Un péptido se distingue de una proteína nativa debido a que su secuencia generalmente es menor que la secuencia de la proteína nativa. El péptido puede aislarse de la digestión de una proteína o prepararse sintéticamente. La secuencia de aminoácidos del péptido puede ser idéntica a la secuencia de la proteína nativa o modificada. La modificación puede ser por conversión enzimática de uno o más

residuos de aminoácido particulares en otros residuos de aminoácido. Además, la modificación puede efectuarse mediante la sustitución, supresión o inserción de uno o más residuos de aminoácido durante la síntesis del péptido.

5 El término "autoanticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina dirigida contra la propia proteína, carbohidrato, ácido nucleico u otra molécula presente en el cuerpo del ser humano. Más específicamente, el término "autoanticuerpo" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a un antígeno propio o fragmento del mismo.

10 La expresión "diana de la enfermedad autoinmunitaria" o "diana" se refiere a una molécula, tal como un antígeno, contra la que puede obtenerse una respuesta autoinmunitaria, en la que una respuesta obtenida puede detectarse usando un ensayo diagnóstico. Más específicamente, como se usa en el presente documento, la expresión "diana de la enfermedad autoinmunitaria" se refiere a una proteína, tal como un antígeno proteínico, que se usa para determinar la presencia, ausencia, o cantidad de un anticuerpo en una muestra de un sujeto. Adicionalmente, la "diana de la enfermedad autoinmunitaria" es una molécula inmunogénica que comparte al menos un epítipo con una proteína de un antígeno implicado en una enfermedad autoinmunitaria.

15 La expresión "prueba de diagnóstico basada en anticuerpos" o "prueba de inmunodiagnóstico" se refiere a una prueba de diagnóstico o ensayo, para detectar la presencia o ausencia de autoanticuerpos para las dianas definidas, tales como antígenos propios. Más específicamente, la expresión "prueba de diagnóstico basada en anticuerpos" es un ensayo en el que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno para proporcionar la detección y/o cuantificación del anticuerpo o antígeno. Una "prueba de diagnóstico basada en anticuerpos" se caracteriza por el uso de propiedades de unión específicas de un anticuerpo particular para aislar, captar y/o cuantificar el antígeno.

20 La expresión "antígeno de bloqueo" se refiere a cualquier antígeno derivado del DFS70 usado como un antígeno de bloqueo.

La expresión "anticuerpo de interferencia" se refiere a cualquier anticuerpo que se une a un antígeno de bloqueo.

25 La expresión "muestra objeto" se refiere a diversas muestras que incluyen, pero sin limitarse a las mismas, suero, plasma, lisado de células, leche, saliva, fluido vítreo, líquido lacrimonasal, homogeneizado de tejido, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural y homogeneizado de tejido. Las muestras para la detección de los autoanticuerpos circulantes incluyen, por ejemplo, sangre, suero y plasma. En una realización, por conveniencia, la muestra es plasma o suero, a pesar de que se ha informado que la saliva es una muestra biológica adecuada para medir la presencia de autoanticuerpos antimicrobianos como se describe en el presente documento. El término "sujeto" o "paciente", como se usa en el presente documento, se refiere a una variedad de especies animales de la que puede obtenerse una muestra para la detección de la presencia de una enfermedad autoinmunitaria. Éstos animales incluyen, pero sin limitación, mamíferos, pájaros, reptiles y peces. Más específicamente, el sujeto es un mamífero y más específicamente, el mamífero es un ser humano. El sujeto también puede padecer una enfermedad infecciosa, cáncer, una respuesta a una vacuna, u otros estados en los que la medición de la respuesta del anticuerpo resulta ser útil.

Enfermedad autoinmunitaria

35 La enfermedad autoinmunitaria se produce cuando el sistema inmunitario no funciona correctamente, interpretando las macromoléculas o tejidos del propio cuerpo como extraños y produciendo autoanticuerpos o células inmunitarias que se dirigen y atacan a macromoléculas, células o tejidos particulares del cuerpo. Al igual de lo que ocurre con una respuesta inmunitaria normal contra una molécula extraña, la respuesta autoinmunitaria también produce diferentes clases en diferentes etapas de una enfermedad autoinmunitaria. Cada sistema de un órgano individual del ser humano puede verse afectado, incluyendo el sistema nervioso, gastrointestinal, endocrino, circulatorio, así como los tejidos conectivos y ojos. Las enfermedades autoinmunitarias incluyen más de 80 enfermedades crónicas muy variadas que afectan a un 5-7 % de la población, siendo mujeres alrededor de dos tercios de los cuales son mujeres. Como grupo son las enfermedades menos comprendidas. Se sospecha que estas enfermedades tienen predisposición genética, pero están provocadas por una infección u otros factores desencadenantes.

45 Los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunitarios incluyen, pero sin limitación, encefalomiелitis aguda diseminada (EAD), leucoencefalitis aguda necrotizante hemorrágica, enfermedad de Addison, agammaglobulinemia, alopecia areata, amiloidosis, espondilitis anquilosante, nefritis anti-MBG (enfermedad de Goodpasture), síndrome antifosfolípido (SAF), angioedema autoinmunitario, anemia aplásica autoinmunitaria, disautonomía autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, hiperlipidemia autoinmunitaria, inmunodeficiencia autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del oído interno (EAOI), miocarditis autoinmunitaria, pancreatitis autoinmunitaria, retinopatía autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (PTA), enfermedad tiroidea autoinmunitaria, urticaria autoinmunitaria, neuropatías axonal y neuronal, enfermedad de Baló, enfermedad de Behçet, penfigoide bulloso, miocardiopatía, enfermedad de Castleman, enfermedad celíaca, enfermedad de Chagas, síndrome de fatiga crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC), osteomielitis multifocal recurrente crónica (OMRC),
55 síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial / penfigoide benigno de las mucosas, enfermedad de Crohn, síndrome de Cogan, enfermedad de aglutinina fría, bloqueo cardíaco congénito, miocarditis por Coxsackie y la enfermedad de CREST.

Otros ejemplos incluyen crioglobulinemia mixta esencial, neuropatías desmielinizantes, dermatitis herpetiforme, dermatomiositis, enfermedad de Devic (neuromielitis óptica), lupus discoide, síndrome de Dressler, endometriosis, fascitis eosinofílica, eritema nudoso, síndrome de Evans, fibromialgia, alveolitis fibrosante, arteritis de células gigantes (arteritis temporal), glomerulonefritis, granulomatosis con poliangitis (GP) véase enfermedad de Wegener, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, encefalitis de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica, púrpura de Henoch-Schonlein, herpes gestacional, hipogammaglobulinemia, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), nefropatía por IgA, enfermedad esclerosante relacionada con IgG4, lipoproteínas inmunorreguladoras, miositis con cuerpos de inclusión, diabetes dependiente de insulina (tipo 1), cistitis intersticial, artritis juvenil, diabetes juvenil, síndrome de Kawasaki, síndrome de Lambert-Eaton, vasculitis leucocitoclástica, liquen plano, liquen escleroso, conjuntivitis leñosa, enfermedad IgA lineal (EAL), Lupus (LES), enfermedad de Lyme crónica, enfermedad de Meniere, poliangeítis microscópica, enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC), úlcera de Mooren, enfermedad de Mucha-Habermann, esclerosis múltiple, miastenia gravis, miositis, narcolepsia, neuromielitis óptica (de Devic), neutropenia, penfigoide cicatricial ocular y neuritis óptica.

Aún otros ejemplos incluyen reumatismo palindrómico, PANDAS (trastornos neuropsiquiátricos pediátricos autoinmunitarios asociados con *Streptococcus*), degeneración cerebelosa paraneoplásica, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), síndrome de Romberg, síndrome de Parsonage-Turner, Pars planitis (uveítis periférica), pénfigo, neuropatía periférica, encefalomielitis perivenosa, anemia perniciosa, síndrome de POEMS, poliarteritis nodosa, síndromes poliglandulares autoinmunitarios de tipo I, II y III, polimialgia reumática, polimiositis, síndrome postinfarto de miocardio, síndrome postpericardiotomía, dermatitis por progesterona, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fibrosis pulmonar idiopática, pioderma gangrenoso, aplasia pura de células rojas, fenómeno de Raynaud, distrofia simpática refleja, síndrome de Reiter, policondritis recidivante, síndrome de piernas inquietas, fibrosis retroperitoneal, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, síndrome de Schmidt, escleritis, escleroderma, síndrome de Sjögren, autoinmunidad del esperma y testicular, síndrome de la persona rígida, endocarditis bacteriana subaguda (EBS), síndrome de Susac, oftalmía simpática, arteritis de Takayasu, arteritis temporal / arteritis de células gigantes, púrpura trombocitopénica (PT), síndrome de Tolosa-Hunt, mielitis transversa, colitis ulcerosa, enfermedad indiferenciada del tejido conectivo (EITC), uveítis, vasculitis, dermatosis vesiculoampollosas, vitiligo, granulomatosis de Wegener (ahora denominada granulomatosis con poliangitis (GP)).

Autoanticuerpos

El sistema inmunitario del ser humano protege al cuerpo contra la infección mediante la generación de anticuerpos contra sustancias extrañas o produciendo linfocitos T citotóxicos que tienen receptores que reconocen ciertos péptidos que invaden o infectan las células. Los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas, abreviado "Ig", están en la superficie de los linfocitos B y en la sangre u otros líquidos corporales de los vertebrados. Normalmente están compuestos de unidades estructurales básicas cada una con dos cadenas pesadas grandes y dos cadenas ligeras pequeñas para formar, por ejemplo, monómeros con una unidad básica, dímeros con dos unidades o pentámeros con cinco unidades. Existen varios tipos diferentes de cadenas pesadas de anticuerpos, y varios tipos diferentes de anticuerpos, que se agrupan en diferentes isotipos en base a que cadena pesada poseen. Se conocen cinco isotipos diferentes de anticuerpos en los mamíferos, IgM, IgA, IgG, IgD e IgE, que desempeñan diferentes funciones, y ayudan a dirigir la respuesta inmunitaria apropiada para cada tipo diferente de molécula extraña que se encuentran.

Aunque la estructura general de todos los anticuerpos es muy similar, una pequeña región en la punta de la proteína es extremadamente variable, lo que permite que existan millones de anticuerpos con estructuras en la punta ligeramente diferentes. Esta región se conoce como la región hipervariable que incluye la región determinante de complementariedad (RDC). Cada una de estas variantes puede unirse a una diana diferente, conocida como antígeno. Esta enorme diversidad de anticuerpos permite que el sistema inmunitario reconozca igualmente una amplia diversidad de antígenos. La única parte del antígeno reconocida por un anticuerpo se denomina epítipo. Estos epítipos se unen con su anticuerpo correspondiente en una interacción altamente específica, denominada de ajuste inducido, que permite a los anticuerpos identificar y unirse solo a su antígeno único entre los millones de moléculas diferentes que componen un organismo. El reconocimiento de un antígeno por un anticuerpo dirige el ataque de otras partes del sistema inmunitario. Los anticuerpos también pueden neutralizar dianas directamente mediante, por ejemplo, la unión a una parte de un patógeno que la necesita para causar una infección.

La gran y diversa población de anticuerpos se genera por combinaciones aleatorias de un conjunto de segmentos de genes que codifican diferentes sitios de unión a antígenos (o paratopos), seguido de mutaciones aleatorias en esta zona del gen del anticuerpo, que crean aún más diversidad. Una selección de anticuerpos con alta afinidad por el patógeno conduce a los resultados de la respuesta inmunitaria en un aumento de la producción de anticuerpos reactivos. Los genes de los anticuerpos también se reorganizan en un proceso denominado cambio de clase que cambia la base de la cadena pesada a otra, creando de un isotipo del anticuerpo diferente que retiene la región variable específica del antígeno. El cambio de clase permite que una única reactividad del anticuerpo se use por varias partes diferentes del sistema inmunitario. La producción de anticuerpos es la principal función del sistema inmunitario humoral.

Cada clase de anticuerpo se adapta estructuralmente para una actividad y funciones biológicas particulares de la mejor forma a una parte diferente en el cuerpo. Esto es porque existen varios genes para la región constante de la cadena H. Por lo tanto, cada clase/subclase de anticuerpo, a través de su región Fc lleva a cabo una función particular. En algunos casos, los anticuerpos de diferentes clases pueden expresarse en etapas diferentes de una infección o enfermedad incluso se ha pensado que tienen la misma actividad biológica, por ejemplo, la IgM e IgG en la fijación del complemento.

La detección e identificación de autoanticuerpos en estas enfermedades ha arrojado información valiosa para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de pacientes con enfermedades autoinmunitarias. Actualmente, a pesar de las limitaciones tales como la falta de adaptación a las técnicas de ensayo de alto rendimiento y del gran volumen, alto costo y alto nivel de falsos positivos, los AAN mediante IFI es todavía la estrategia de diagnóstico más popular para la detección de autoanticuerpos en el suero y plasma de pacientes de los que se sospecha que tienen una enfermedad autoinmunitaria sistémica. Sin embargo, una contribución fiable de la serología de un autoanticuerpo para el diagnóstico de la enfermedad autoinmunitaria aún requiere que se realicen múltiples ensayos.

Recientemente, sin embargo, los autoanticuerpos que producen un patrón de tinción referidos como moteado fino denso nuclear se han relacionado con la enfermedad autoinmunitaria como un biomarcador para descartar el diagnóstico de la enfermedad autoinmunitaria.

DFS70

El DFS70 se ha identificado inicialmente como una proteína de ~ 70 kDa a través de experimentos de inmunotransferencia usando el suero de pacientes con cistitis intersticial. En los últimos años, se ha informado de que aproximadamente el 20 % de los individuos sanos contenían AAN, en los que los anticuerpos anti moteado fino denso 70 ("anti-DFS70") representan una causa principal de resultados de falso positivo. Inicialmente los anti-DFS70 se han identificado como un AAN de un paciente con cistitis intersticial, pero los autoanticuerpos se han asociado más tarde con diversas condiciones de enfermedad y especialmente con dermatitis atópica. El patrón de tinción de IFI típico se ha descrito como un DFS distribuido a través del núcleo y en la cromatina en metafase. Adicionalmente, aunque se ha reconocido una proteína de 70 kDa mediante inmunotransferencia y el antígeno se ha denominado inicialmente moteado fino denso 70 (DFS70), el principal autoantígeno diana se ha identificado posteriormente como el factor de crecimiento derivado del epitelio del cristalino ("LEDGF") o coactivador de la transcripción de ADN p75. Se cree que esta proteína tiene varias funciones fisiológicas, que incluyen servir como cofactor para la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana a través de una interacción con la integrasa viral, y también se expresa altamente en el tejido tumoral de la próstata.

Desde su primera caracterización, los anticuerpos anti-DFS70 se han encontrado en el suero de pacientes con una variedad de condiciones inflamatorias crónicas, pacientes con cáncer e incluso en algunos individuos sanos. En 2005, Dellavance y col. han evaluado más de 10.000 muestras positivas de AAN mediante IFI y después inmunotransferencia, informando que los anticuerpos anti-DFS70 eran comunes entre los individuos con AAN positivo sin evidencia de enfermedad reumática autoinmunitaria ("ERA"), y que entre los pacientes autoinmunitarios con este autoanticuerpo, más del 50 % tenían evidencias de tiroiditis autoinmunitaria. Se ha informado de la prevalencia más alta de anticuerpos anti-DFS70 en pacientes con el síndrome de Vogt-Harada (66,7 %) y dermatitis atópica (30 %), seguido de individuos sanos (~ 10 %) mientras que su prevalencia en la ERA es significativamente menor (~ 2-3 %). Además, cuando se considera el pronóstico y el resultado a largo plazo de los individuos que tienen anticuerpos anti-DFS70, se ha informado recientemente que ninguno de los 40 individuos sanos con anti-DFS70 positivo desarrollaron una enfermedad autoinmunitaria en un intervalo medio de 4 años. Esta observación es de gran importancia ya que se ha informado de que algunos autoanticuerpos predicen la aparición de ERAS durante muchos años. Por lo tanto, la presente invención implica la constatación de que la utilización de la proteína DFS70 como un antígeno de bloqueo proporciona un valor diagnóstico para descartar posibles resultados de falso positivo y por lo tanto hace más fiables los resultados de la prueba de AAN, de modo que aumenta la probabilidad de una contribución correcta para el diagnóstico.

La siguiente enseñanza divulga diversas realizaciones de la presente invención. Un experto en la materia identificará fácilmente que se pueden usar otras realizaciones. Por lo tanto, las enseñanzas particulares establecidas a continuación no son limitativas de ninguna manera de la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

El antígeno de bloqueo de la presente invención puede purificarse de una fuente natural, producirse de manera recombinante o prepararse sintéticamente. Puede ser una proteína de longitud completa, una parte de la proteína de longitud completa o un péptido que comprenda uno o más determinantes antigénicos de una o más proteínas. La secuencia puede ser idéntica a la secuencia de la proteína nativa o puede estar modificada.

Además, los vectores de expresión pueden utilizarse para preparar péptidos antigénicos. Un segmento de ADN que codifica para un péptido puede sintetizarse mediante técnicas químicas, por ejemplo, el procedimiento del fosfotriéster de Matteucci M.D. y col. (J. Am. Chem. Soc., 103:3185 (1981)). Después el segmento de ADN puede ligarse a un vector de expresión y puede usarse una célula huésped transformada con el vector para producir el péptido. Véase, por ejemplo, Current Protocols In Molecular Biology, Ausubel, F.M. y col., eds., John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y. y las Patentes de Estados Unidos n.º 4.237.224, 4.356.270, 4.468.464, 4.683.195 y 4.889.818.

El antígeno también puede prepararse usando la técnica de síntesis en fase sólida inicialmente descrita por R. B. Merrifield (J. Am. Chem. Soc., 1963, 85:2149-2154). Pueden encontrarse otras técnicas de síntesis, por ejemplo, en Bodanszky, M. y col., Peptide Synthesis, John Wiley & Sons, 2ª Ed., (1976) así como en otros trabajos de referencia conocidos por los expertos en la materia. Puede encontrarse un resumen de las técnicas de síntesis en J. Stuart y J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., 3ª Ed., Neurath, H. y col., Eds., p. 104-237, Academic Press, Nueva York, N.Y. (1976). Los grupos protectores adecuados para su uso en dichas síntesis se encontrarán en los textos anteriores, así como en J. F. W. McOmie, Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, Nueva York, N.Y. (1973).

En general, los procedimientos sintéticos comprenden la adición secuencial de uno o más residuos de aminoácido o residuos de aminoácido protegidos a una cadena de polipéptido en crecimiento. En la síntesis en fase sólida, el aminoácido protegido o derivatizado se une a un soporte sólido inerte a través de su grupo carboxilo o amino no protegido. Después el grupo protector del grupo amino o carboxilo se retira selectivamente y se mezcla de manera similar el siguiente residuo de aminoácido protegido en la secuencia y se hace reaccionar en condiciones adecuadas para formar el enlace amida con el residuo unido al soporte sólido. Después el grupo protector del grupo amino y carboxilo se retira de este residuo recién añadido y después se añade el siguiente residuo en la secuencia, y así sucesivamente. Después de que todos los aminoácidos deseados se han unido en la secuencia apropiada, se retira secuencial o simultáneamente cualquiera de los grupos protectores restantes del grupo terminal y lateral. Después la secuencia de aminoácidos se separa del soporte sólido. Para controlar la formación de enlaces disulfuro de un péptido que tiene múltiples residuos de cisteína, pueden usarse diferentes grupos protectores que pueden retirarse independientemente permitiendo que solo las cisteínas que se desean sean reactivas para la formación del enlace disulfuro (Hargittai, B. y Barany, G., 1999, J. Peptide Res. 54:468-479).

La secuencia de aminoácidos del antígeno puede modificarse si se purifica de una fuente natural, se produce de manera recombinante o se prepara sintéticamente. El antígeno modificado se selecciona para que sea una variante funcional o inmunológicamente equivalente de las variaciones biológicas que suceden naturalmente (por ejemplo, las variantes alélicas, ortólogos, variantes de empalme o variantes post-transcripcionales).

Las modificaciones post-transcripcionales que suceden durante la vida de una proteína se consideran "sustituciones permisibles" de los residuos de aminoácido y pueden mejorar la unión de la secuencia antigénica al autoanticuerpo. Si bien no se conocen todas las modificaciones post-transcripcionales de las proteínas, se anticipa que un experto en la materia haría sustituciones permisibles dentro de las secuencias de aminoácidos para determinar si puede lograrse la unión mejorada una vez se identifican tales modificaciones post-transcripcionales para esa proteína en particular. Los ensayos ELISA pueden determinar fácilmente las secuencias modificadas que tienen una reactividad y/o selectividad aumentada para un anticuerpo.

Otras modificaciones dentro del alcance de la presente invención proporcionan algunas ventajas en el uso del antígeno, específicamente en su capacidad para imitar el sitio antigénico de la proteína, así como la afinidad por el autoanticuerpo de interés. Estas modificaciones, referidas como "variantes", incluyen cualquier secuencia de aminoácidos en la que uno o más residuos se han añadido o insertado, eliminado o sustituido con otro residuo. El término "sustituido" incluye las modificaciones de un residuo de aminoácido existente mediante mutagénesis de sitio dirigido, mutagénesis aleatoria o mediante tratamiento químico, tal como mediante modificación enzimática.

Las variantes de adición incluyen fusiones N- o C- terminal e inserciones intrasecuencia de aminoácidos individuales o múltiples. En un tipo de variante de adición, los residuos de cisteína pueden añadirse en los extremos de las secuencias de aminoácidos o insertarse entre las secuencias de aminoácidos. Estos residuos de cisteína pueden utilizarse para formar enlaces disulfuro en el péptido o entre dos o más péptidos. Se conoce bien en la técnica que los péptidos cíclicos, así como los complejos que contienen múltiples copias de péptidos antigénicos, proporcionan uniones mejoradas a sus dianas en comparación con sus homólogos lineales. El número de conformaciones que pueden formarse por el péptido dependerá de la cantidad de residuos de cisteína en la secuencia de aminoácidos. El control de la formación del enlace disulfuro intramolecular puede alcanzarse usando grupos protectores que pueden retirarse selectivamente (Hargittai, B. y Barany, G., 1999, J. Peptide Res. 54:468-479). También se ha encontrado que los enlaces disulfuro preferenciales pueden formarse mediante la inserción de residuos de aminoácido cargados adyacentes a los residuos de cisteína. Específicamente, cuando se prefiere un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína inespecíficos, los residuos de aminoácido cargados opuestamente pueden colocarse adyacentes a estas cisteínas para promover la unión a través de interacciones de carga. En la misma medida, donde algunos residuos de cisteína están flanqueados por aminoácidos cargados idénticamente, se prevé que no se favorecerá la formación de disulfuro. Adicionalmente, la formación de puentes sulfhidrilo intramoleculares e intermoleculares también puede controlarse por el pH y la concentración de antígeno.

Las variantes de delección pueden prepararse mediante truncamientos del N- o C- terminal o por la eliminación intrasecuencia de los residuos de aminoácido. Los truncamientos pueden prepararse por digestión de las secuencias antigénicas purificadas obtenidas de la proteína. Alternativamente, la secuencia antigénica puede prepararse sintéticamente, o de manera recombinante al tener delecciones intrasecuencia o truncamientos terminales.

Las sustituciones de aminoácidos dentro de la secuencia antigénica pueden usarse para alterar la función o características químicas del antígeno. Específicamente, los residuos de aminoácido pueden sustituirse para afectar

a la estructura, carga, hidrofobicidad o hidrofiliidad de la secuencia antigénica. Por ejemplo, el aminoácido prolina actúa para restringir la conformación de las secuencias antigénicas, lo que puede resultar en una actividad de unión mejorada para el anticuerpo. El ensayo ELISA puede determinar fácilmente una actividad mejorada de estas secuencias antigénicas modificadas.

5 Las variantes pueden tener desde 1 a 3, 5, 10, 15, 20, 25 o 50 sustituciones, inserciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos. Las sustituciones pueden ser conservadoras, no conservadoras, o una combinación de ambas. Las secuencias antigénicas de la presente invención pueden comprender al menos 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o 50 residuos de aminoácido consecutivos de una proteína natural. Además, pueden ser al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % idénticas a la proteína natural. Adicionalmente, pueden tener una actividad inmunológica de más del 1 %, 10 %, 25 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % de una proteína natural.

10 El antígeno de bloqueo de la presente invención funciona principalmente para unirse a los autoanticuerpos anti-DFS70 en una muestra del paciente de manera que cualquiera de los autoanticuerpos anti-DFS70 que pueden estar presentes se unan y por lo tanto no puedan participar en una reacción posterior con una diana de la enfermedad autoinmunitaria. Esto puede conseguirse incluyendo una etapa de pre-incubación antes de realizar una prueba de inmunodiagnóstico de una muestra objeto con una diana de la enfermedad autoinmunitaria.

15 Para los fines de la presente invención, el antígeno derivado del DFS70 usado como antígeno de bloqueo puede ser una proteína DFS70 de origen natural que se ha extraído usando técnicas de extracción de proteínas bien conocidas por los expertos en la materia. Alternativamente, en diversas realizaciones, la proteína o antígeno del DFS70 puede ser un péptido sintético. En otras realizaciones, la proteína DFS70 puede ser un péptido recombinante producido a través de técnicas de ingeniería molecular.

20 En realizaciones más específicas, el antígeno de bloqueo del DFS70 de la presente invención puede ser un antígeno derivado del DFS70, en el que el antígeno de bloqueo está compuesto de al menos un fragmento de la proteína DFS70. Se ha informado por Ogawa y *col.* (Ogawa et al. 2004 J Autoimmun 23: 221-231) de una evidencia de la variación de la reactividad de los epítomos en antígenos derivados del DFS70 en el que los constructos de DFS70 que comprenden diferentes partes recombinantes de la proteína DFS70 se probaron para la autoantigenicidad. En diversas realizaciones, el antígeno de bloqueo del DFS70 puede ser una proteína completa o un péptido inmunogénico derivado del DFS70. Los antígenos peptídicos adecuados para la unión a autoanticuerpos anti-DFS70 en una muestra del paciente pueden diseñarse, construirse y emplearse de acuerdo con técnicas bien conocidas. Véase, por ejemplo, Harlow & Lane Eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Czernik, Methods in Enzymology, 201: 264-283 (1991); Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 21-49 (1962)). De acuerdo con esto, se contempla en la presente invención que la proteína DFS70, y los fragmentos de la misma, pueden ser adecuados para hacerlos reaccionar como un antígeno de bloqueo en los procedimientos descritos en el presente documento.

25 Se contempla que las modificaciones y cambios pueden hacerse en la preparación de un antígeno de bloqueo del DFS70 y aún obtener una molécula funcional que codifica una proteína con características deseables. Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de la capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión al antígeno de anticuerpos o sitios de unión en moléculas de sustrato. Dado que la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína es lo que define esa actividad funcional biológica de la proteína, algunas sustituciones de aminoácidos pueden hacerse en una secuencia de la proteína y sin embargo obtener una proteína con propiedades similares. Por tanto, se contempla que pueden hacerse diversos cambios en la secuencia de aminoácidos de diversos antígenos derivados del DFS70 sin pérdida apreciable en su utilidad o actividad biológica.

Pre-incubación

35 Preparación de una muestra objeto: En algunas realizaciones de la presente invención, una muestra objeto que consta de suero, plasma u otro fluido corporal como se ha descrito previamente se obtiene del sujeto para la pre-incubación con el antígeno de bloqueo. Además, la muestra objeto puede estar en diversas formas incluyendo, pero sin limitación, líquida, congelada, refrigerada, liofilizada y otras formas conocidas en la técnica. La muestra también puede someterse a unas etapas adicionales de purificación o tratamiento antes de y/o seguido de la etapa de pre-incubación en el presente documento.

40 En diversas realizaciones que se describen a continuación, el uso de la expresión "solución de DFS" se entiende que incluye el antígeno del DFS70 y el antígeno derivado del DFS70 como se ha descrito anteriormente. En una realización ejemplar, la solución de DFS70 puede prepararse diluyendo el antígeno del DFS70 o el antígeno derivado del DFS70 en un tampón para formar una solución de DFS70. En otras realizaciones de la presente invención, el antígeno derivado del DFS70 puede prepararse en diversas formas incluyendo, pero sin limitación, líquida, congelada, refrigerada, liofilizada, inmovilizada en una fase sólida mediante absorción o unida covalentemente y otras formas conocidas en la técnica.

55 Puesta en contacto de la muestra objeto con el antígeno derivado del DFS70: Una realización ejemplar de una etapa de pre-incubación consiste en preparar una solución de DFS70 para usarse como diluyente, en la que una muestra objeto se pone en contacto con la solución de DFS70 para absorber los anticuerpos anti-DFS70. En realizaciones

preferidas, la muestra objeto se pone en contacto con la solución de DFS70 en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de complejos inmunitarios entre el antígeno del DFS70 y los anticuerpos anti-DFS70 que pueden estar o no presentes en la muestra objeto.

Efecto de desenmascaramiento

5 En diversas realizaciones de la presente invención, una de las ventajas proporcionadas por la pre-incubación de una muestra objeto con el antígeno de bloqueo es un efecto de desenmascaramiento que aumenta la precisión de las pruebas de inmunodiagnóstico. En realizaciones ejemplares, se consigue el desenmascaramiento de otros anticuerpos cuando los anticuerpos anti-DFS70 en una muestra de un paciente se absorben mediante la adición del antígeno de bloqueo del DFS70 durante una etapa de pre-incubación. Más específicamente, la absorción de anticuerpos anti-DFS70 en la muestra del paciente evitará que el patrón del DFS70 emerja en las pruebas de inmunodiagnóstico con una diana de la enfermedad autoinmunitaria, evitando de este modo ocultar los patrones de fluorescencia pertenecientes a otros anticuerpos. Por lo tanto, el bloqueo de la aparición del patrón del DFS70 en los resultados de inmunodiagnóstico permite la identificación mejorada de otros autoanticuerpos asociados con la autoinmunidad sistémica. En particular, el bloqueo de los patrones del DFS70 permite la identificación de autoanticuerpos que de otro modo no podría haber sido lograda, permitiendo una interpretación más fácil de los resultados de la prueba y por lo tanto diagnósticos más precisos de los pacientes con enfermedad autoinmunitaria.

Formato de ensayo

20 Los procedimientos de ensayo de fase sólida y líquida útiles conocidos en la técnica pueden utilizarse con la presente invención. Mientras que un ensayo particular que se ha descrito en el presente documento es un ensayo de inmunofluorescencia, la presente invención no se limita específicamente a este tipo de ensayo.

Otros inmunoensayos bien conocidos que pueden adaptarse para detectar el nivel de autoanticuerpos en una muestra que se hace reaccionar con un antígeno incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayo inmunoabsorbente fluorescente (EIF), ensayo inmunoabsorbente quimioluminiscente (EIQ), radioinmunoensayo (RIE), técnicas de inmunoensayo enzimático multiplicado (TIEM), radioinmunoensayo en fase sólida (RIEFS), inmunotransferencia, reacciones de precipitación de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (por ejemplo, usando marcadores de oro coloidal, enzimas o radioisótopos, por ejemplo), transferencias Western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación en gel, ensayos de hemaglutinación, etc.), ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis, etc. Cualquier tecnología de ensayo que resulte en una señal impartida por la reacción de los autoanticuerpos con un antígeno heterogéneo de la presente invención se considera en diversas realizaciones de la presente invención. Cada uno de los procedimientos de ensayo puede emplear técnicas de anticuerpos individuales o dobles en las que se utiliza un medio indicador para señalar la inmunoreacción y de este modo la unión de un autoanticuerpo para detectarse con un antígeno heterogéneo derivado del DFS70 de la presente invención. Para una revisión de los diferentes inmunoensayos que pueden usarse, véase: *The Immunoassay Handbook*, David Wild, ed., Stockton Press, Nueva York, 1994. Un inmunoensayo competitivo con separación en fase sólida o un ensayo inmunométrico para la prueba de anticuerpos es otro ejemplo de ensayo adecuado para su uso en la presente invención. Véase, *The Immunoassay Handbook*, capítulo 2 y Maggio, *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, Cleveland, Ohio (1981); y en Goldman, *Fluorescent Antibody Methods*, Academic Press, Nueva York, N.Y. (1980).

40 Por ejemplo, una tecnología general de ensayo determina la presencia, y preferentemente la cantidad, de autoanticuerpos en una muestra de fluido biológico en tres etapas. Primero, la muestra de fluido biológico se mezcla con un antígeno para formar una mezcla de inmunoreacción. El antígeno preferentemente se une operativamente a un soporte sólido de manera que la mezcla de inmunoreacción tiene tanto una fase líquida como una fase sólida. A continuación se mantiene la mezcla de inmunoreacción en condiciones biológicas de ensayo durante un periodo de tiempo, normalmente predeterminado, suficiente para formar un complejo antígeno-autoanticuerpo en la fase sólida. En los formatos de ensayo heterogéneos, los reactivos normalmente se separan tras el periodo de mantenimiento, normalmente lavando y reteniendo la fase sólida. En la última etapa se determina la presencia y preferentemente la cantidad del complejo formado en la segunda etapa y con ello la presencia o la cantidad de autoanticuerpos en la muestra del fluido biológico.

50 La prueba de anticuerpos antinucleares fluorescentes (ANNF) se ha diseñado por George Friou, M. D. en 1957 y es una prueba de detección sensible usada para detectar autoanticuerpos (Friou, GJ 1962 *Arthritis Rheum* 5:407-410). Los ANN se encuentran en pacientes con una variedad de enfermedades autoinmunitarias, tales como pero sin limitación lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, polimiositis, dermatomiositis, esclerosis sistémica, tiroiditis de Hashimoto, diabetes mellitus juvenil y enfermedad de Addison y fibrosis pulmonar. Los ANN también pueden encontrarse en pacientes con infecciones crónicas o cáncer. Muchas medicaciones incluyendo procainamida, hidralazina y dilantina pueden estimular la producción de los ANN. La prueba de ANN se solicita cuando alguien muestra signos y síntomas que se asocian con el LES u otro trastorno autoinmunitario. Las personas con trastornos autoinmunitarios pueden tener una amplia variedad de síntomas tales como febrícula, dolor en las articulaciones, fatiga y/o erupciones cutáneas inexplicables que pueden cambiar con el tiempo. En todos los casos que se han mencionado anteriormente, y adicionalmente de acuerdo con los procedimientos y otros ensayos

de inmunodiagnóstico descritos en el presente documento, la absorción de los anticuerpos anti-DFS70 mejora significativamente la precisión de la ANNF.

5 Los ANN generan una amplia variedad de patrones de tinción diferentes en células HEp-2, una línea celular que se usa con frecuencia para la prueba de ANN. Algunos patrones son altamente indicativos para el autoanticuerpo provocando el patrón de tinción (es decir, anticuerpos anti-centrómero) mientras que otros no son indicativos para una cierta especificidad del anticuerpo. Por lo tanto, se requiere de pruebas de confirmación extensas para identificar los anticuerpos presentes en la muestra.

Ha de entenderse que la presente invención se aplica a una amplia variedad de procedimientos de detección, para los que la etapa de pre-incubación descrita a continuación puede modificarse adecuadamente en consecuencia.

10 Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de la muestra del paciente

15 El suero de los individuos sanos (n=124, 86 mujeres y 38 hombres) se obtuvo de una fuente comercial (Promedix, Union, NJ). La edad media era de 37 años (desviación estándar 13,1 años; 17-60 años). Las muestras de los pacientes con LES se recogieron en la facultad de medicina, Dalhousie University (Halifax, NS, Canadá). El diagnóstico de los pacientes con LES se estableció de acuerdo con los criterios de enfermedad de la AC. Los datos de los pacientes se usaron de manera anónima considerando la última versión de la Declaración de Helsinki sobre principios éticos de la investigación en seres humanos. La recogida de muestras de los pacientes se llevó a cabo de acuerdo con las regulaciones del comité local de ética y donde la aprobación por escrito necesaria se obtuvo de la respectiva Junta de Revisión Institucional.

Ejemplo 2

Pre-incubación con el antígeno de bloqueo

25 La secuencia de ADN que codifica para el fragmento de antígeno recombinante DFS70 se clonó en el vector de expresión pEXBac-3 y la proteína recombinante se expresó en células de insecto (células SF9, Invitrogen). La preparación de los fragmentos del antígeno recombinante DFS70 se basó en los procedimientos descritos en Ogawa y col., (Ogawa y col. 2004 J Autoimmun 23:221-231). La purificación del antígeno del DFS70 etiquetado con histidina se hizo usando una columna de níquel. La pureza del antígeno se verificó mediante electroforesis en gel y resultó ser > 95 %.

30 El recombinante DFS70 se diluyó en PBS a una concentración final de aproximadamente 0,6 mg/ml. Después la solución de DFS70 resultante se usó como el diluyente de la muestra para absorber los anticuerpos anti-DFS70. El suero de los pacientes con enfermedades autoinmunitarias sistémicas y de individuos sanos que previamente se habían identificado como anticuerpo anti-DFS70 positivo (mediante QUANTA Flash DFS70) se diluyó 1/40 en a.) PBS y b.) en solución de DFS70. Después las muestras diluidas se probaron para los AAN en células HEp-2 (NOVA Lite^(R), INOVA Diagnostics, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras diluidas se aplicaron a los portaobjetos y se incubaron durante 30 minutos. Los anticuerpos no unidos se retiraron mediante lavado. Se añadió el anticuerpo secundario conjugado con isotiocianato de fluoresceína (ITCF). Después la intensidad de la fluorescencia se midió usando un sistema de imagen digital (NOVA View^(R), INOVA Diagnostics, San Diego, CA).

Ejemplo 3

40 Prueba de inmunodiagnóstico

La inmunofluorescencia indirecta se hizo usando células NOVA Lite^(R) HEp-2 (INOVA Diagnostics, San Diego, CA). El suero se probó a una dilución 1:40 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La lectura de los portaobjetos se llevó a cabo usando un sistema de imagen digital de IFI (NOVA View^(R) Inova Diagnostics, San Diego, CA).

45 El ensayo QUANTA Flash™ DFS70 es un nuevo ensayo de quimioluminiscencia (QL) llevado a cabo en el instrumento BIO-FLASH® (biokit s.a., Barcelona, España). El ensayo usa el recombinante DFS70 como se describió anteriormente, también se usa actualmente solo para fines de investigación y utiliza el instrumento BIO-FLASH®, que contiene un luminómetro, así como todas las herramientas y los accesorios para la manipulación del líquido necesario para llevar a cabo el ensayo.

50 Un ensayo de tipo QUANTA Flash™ se desarrolló usando recombinante DFS70 recubierto sobre partículas de látex paramagnético. Antes de su uso, el paquete de reactivos que contiene todos los reactivos de ensayo necesarios se invierte suavemente treinta veces. Después los tubos de reactivos sellados se perforan con el tapón del paquete de reactivos. La muestra de suero de un paciente se prediluye con el tampón de la muestra BIO-FLASH® en una pequeña cubeta de plástico desechable. Se combinan pequeñas cantidades del suero diluido del paciente, las

partículas y el tampón de ensayo todos en una segunda cubeta, se mezclan y después se incuban durante 9,5 minutos a 37 °C. Las partículas magnetizadas se sedimentan y se lavan varias veces seguido de la adición de anti-IgG humana conjugada con isoluminol y de nuevo se incuban 9,5 minutos a 37 °C. Las partículas magnetizadas se sedimentan y se lavan repetidamente. El conjugado de isoluminol se oxida cuando se añaden a la cubeta una solución de hidróxido de sodio y soluciones de peróxido (“Activadores”) y el destello de luz producido de esta reacción se mide como Unidades Relativas de Luz (URL) mediante el sistema óptico del BIO-FLASH®. Las URL son proporcionales a la cantidad de conjugado de isoluminol que se une a la IgG humana, que a su vez es proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-DFS70 unidos al antígeno sobre las partículas.

Los anticuerpos para ADNdh, cromatina, SS-A (tanto Ro52 como Ro60), SS-B, ribosoma P, C1Q, RNP y Sm se determinaron mediante los QUANTA Lite ELISA (INOVA, San Diego, US) todos llevados a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 4

Análisis de los resultados

Los datos se evaluaron estadísticamente usando el programa Analyse-it (Versión 2.03; Analyse-it Software, Ltd. Leeds, Reino Unido). Se llevó a cabo la prueba de Spearman para analizar la correlación entre el QUANTA Flash DFS70 y el IFI con NOVA View. Los valores de p<0,05 se consideraron significativos.

En una cohorte de 251 pacientes con LES, se identificaron anticuerpos anti-DFS70 en 7 (2,8 %) de los pacientes. Solo 1 de cada 7 pacientes no tenía otros anticuerpos detectables. Además, se encontraron anticuerpos anti-DFS70 en 11 de cada 124 (8,9 %) individuos aparentemente sanos.

Se probaron diez muestras QUANTA Flash DFS70 positivas, junto con una muestra en el límite mediante IFI. Se encontró que las diez muestras positivas eran positivas por completo y la muestra en el límite era negativa. 7 de 7 muestras anti-DFS70 positivas de pacientes con LES también eran positivas mediante IFI.

Solo 1 de 7 pacientes (14,3 %) con LES anti-DFS70 positivo (o 1/251 con LES, 0,4 %) se volvieron negativos cuando la dilución de la muestra se preincubó con antígeno del DFS70. Por el contrario, 8 de 10 (80,0 %) individuos aparentemente sanos se volvieron negativos cuando la dilución de la muestra se preincubó con antígeno del DFS70. Las dos muestras que permanecieron positivas tenían al menos un anticuerpo adicional.

La disminución en la reactividad era significativamente más pronunciada en individuos sanos comparado con los pacientes con LES. Tras la inmunoabsorción, la reactividad media era 24,5 % en individuos sanos y 64,3 % en pacientes con LES comparado con los resultados anteriores a la absorción.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Inova Diagnostics, Inc.
- <120> PROCEDIMIENTO PARA AUMENTAR LA ESPECIFICIDAD DE PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO PARA ENFERMEDADES AUTOINMUNITARIAS
- <130> 93352PCT
- <140> PCT/US2011/042783
- <141> 01-07-2011
- <160> 9
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 530
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintética
- <400> 1

ES 2 574 790 T3

Met Thr Arg Asp Phe Lys Pro Gly Asp Leu Ile Phe Ala Lys Met Lys
 1 5 10 15

Gly Tyr Pro His Trp Pro Ala Arg Val Asp Glu Val Pro Asp Gly Ala
 20 25 30

Val Lys Pro Pro Thr Asn Lys Leu Pro Ile Phe Phe Phe Gly Thr His
 35 40 45

Glu Thr Ala Phe Leu Gly Pro Lys Asp Ile Phe Pro Tyr Ser Glu Asn
 50 55 60

Lys Glu Lys Tyr Gly Lys Pro Asn Lys Arg Lys Gly Phe Asn Glu Gly
 65 70 75 80

Leu Trp Glu Ile Asp Asn Asn Pro Lys Val Lys Phe Ser Ser Gln Gln
 85 90 95

Ala Ala Thr Lys Gln Ser Asn Ala Ser Ser Asp Val Glu Val Glu Glu
 100 105 110

Lys Glu Thr Ser Val Ser Lys Glu Asp Thr Asp His Glu Glu Lys Ala
 115 120 125

Ser Asn Glu Asp Val Thr Lys Ala Val Asp Ile Thr Thr Pro Lys Ala
 130 135 140

Ala Arg Arg Gly Arg Lys Arg Lys Ala Glu Lys Gln Val Glu Thr Glu

ES 2 574 790 T3

Lys Lys Ile Arg Arg Phe Lys Val Ser Gln Val Ile Met Glu Lys Ser
 405 410 415

Thr Met Leu Tyr Asn Lys Phe Lys Asn Met Phe Leu Val Gly Glu Gly
 420 425 430

Asp Ser Val Ile Thr Gln Val Leu Asn Lys Ser Leu Ala Glu Gln Arg
 435 440 445

Gln His Glu Glu Ala Asn Lys Thr Lys Asp Gln Gly Lys Lys Gly Pro
 450 455 460

Asn Lys Lys Leu Glu Lys Glu Gln Thr Gly Ser Lys Thr Leu Asn Gly
 465 470 475 480

Gly Ser Asp Ala Gln Asp Gly Asn Gln Pro Gln His Asn Gly Glu Ser
 485 490 495

Asn Glu Asp Ser Lys Asp Asn His Glu Ala Ser Thr Lys Lys Lys Pro
 500 505 510

Ser Ser Glu Glu Arg Glu Thr Glu Ile Ser Leu Lys Asp Ser Thr Leu
 515 520 525

Asp Asn
 530

<210> 2
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintética

<400>2

Met Thr Arg Asp Phe Lys Pro Gly Asp Leu Ile Phe Ala Lys Met Lys
 1 5 10 15

Gly Tyr Pro His Trp Pro Ala Arg Val Asp Glu Val Pro Asp Gly Ala
 20 25 30

Val Lys Pro Pro Thr Asn Lys Leu Pro Ile Phe Phe Phe Gly Thr His
 35 40 45

Glu Thr Ala Phe Leu Gly Pro Lys Asp Ile Phe Pro Tyr Ser Glu Asn
 50 55 60

Lys Glu Lys Tyr Gly Lys Pro Asn Lys Arg Lys Gly Phe Asn Glu Gly

5

10

<220>
<223> Sintética

5 <400>3

Glu Thr Glu Gln Gln Asn Lys Asp Glu Gly Lys Lys Pro Glu Val Lys
 1 5 10 15
 Lys Val Glu Lys Lys Arg Glu Thr Ser Met Asp Ser Arg Leu Gln Arg
 20 25 30
 Ile His Ala Glu Ile Lys Asn Ser Leu Lys Ile Asp Asn Leu Asp Val
 35 40 45
 Asn Arg Cys Ile Glu Ala Leu Asp Glu Leu Ala Ser Leu Gln Val Thr
 50 55 60
 Met Gln Gln Ala Gln Lys His Thr Glu Met Ile Thr Thr Leu Lys Lys
 65 70 75 80
 Ile Arg Arg Phe Lys Val Ser Gln Val Ile Met Glu Lys Ser Thr Met
 85 90 95
 Leu Tyr Asn Lys Phe Lys Asn Met Phe Leu Val Gly Glu Gly Asp Ser
 100 105 110
 Val Ile Thr Gln Val Leu Asn Lys Ser Leu Ala Glu Gln Arg Gln His
 115 120 125
 Glu Glu Ala Asn Lys Thr Lys Asp Gln Gly Lys Lys Gly Pro Asn Lys
 130 135 140
 Lys Leu Glu Lys Glu Gln Thr Gly Ser Lys Thr Leu Asn Gly Gly Ser
 145 150 155 160
 Asp Ala Gln Asp Gly Asn Gln Pro Gln His Asn Gly Glu Ser Asn Glu
 165 170 175
 Asp Ser Lys Asp Asn His Glu Ala Ser Thr Lys Lys Lys Pro Ser Ser
 180 185 190
 Glu Glu Arg Glu Thr Glu Ile Ser Leu Lys Asp Ser Thr Leu Asp Asn
 195 200 205

10 <210> 4
 <211> 156
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Sintética

<400> 4

Glu Ala Leu Asp Glu Leu Ala Ser Leu Gln Val Thr Met Gln Gln Ala
 1 5 10 15
 Gln Lys His Thr Glu Met Ile Thr Thr Leu Lys Lys Ile Arg Arg Phe
 20 25 30
 Lys Val Ser Gln Val Ile Met Glu Lys Ser Thr Met Leu Tyr Asn Lys
 35 40 45
 Phe Lys Asn Met Phe Leu Val Gly Glu Gly Asp Ser Val Ile Thr Gln
 50 55 60
 Val Leu Asn Lys Ser Leu Ala Gln Gln Arg Gln His Gln Glu Ala Asn
 65 70 75 80
 Lys Thr Lys Asp Gln Gly Lys Lys Gly Pro Asn Lys Lys Leu Glu Lys
 85 90 95
 Glu Gln Thr Gly Ser Lys Thr Leu Asn Gly Gly Ser Asp Ala Gln Asp
 100 105 110
 Gly Asn Gln Pro Gln His Asn Gly Glu Ser Asn Glu Asp Ser Lys Asp
 115 120 125
 Asn His Glu Ala Ser Thr Lys Lys Lys Pro Ser Ser Glu Glu Arg Glu
 130 135 140
 Thr Glu Ile Ser Leu Lys Asp Ser Thr Leu Asp Asn
 145 150 155

5

<210> 5
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> Sintética

15

<400> 5

Asp Arg Lys Arg Lys Gln Glu Glu Gln Met Glu Thr Gln Gln Asn
 1 5 10 15
 Lys Asp Glu Gly Lys Lys Pro Glu Val Lys Lys Val Glu Lys Lys Arg
 20 25 30
 Glu Thr Ser Met Asp Ser Arg Leu Gln Arg Ile His Ala Glu Ile Lys
 35 40 45
 Asn Ser Leu Lys Ile Asp Asn Leu Asp Val Asn Arg Cys Ile Glu
 50 55 60

ES 2 574 790 T3

<210> 6
 <211> 85
 <212> PRT
 <213> Artificial Secuencia

5

<220>
 <223> Sintética

10

<400> 6

Glu Thr Glu Gln Gln Asn Lys Asp Glu Gly Lys Lys Pro Glu Val Lys
 1 5 10 15
 Lys Val Glu Lys Lys Arg Glu Thr Ser Met Asp Ser Arg Leu Gln Arg
 20 25 30
 Ile His Ala Glu Ile Lys Asn Ser Leu Lys Ile Asp Asn Leu Asp Val
 35 40 45
 Asn Arg Cys Ile Glu Ala Leu Asp Glu Leu Ala Ser Leu Gln Val Thr
 50 55 60
 Met Gln Gln Ala Gln Lys His Thr Glu Met Ile Thr Thr Leu Lys Lys
 65 70 75 80
 Ile Arg Arg Phe Lys
 85

<210> 7
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Sintética

20

<400> 7

Asp Ser Arg Leu Gln Arg Ile His Ala Glu Ile Lys Asn Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 Ile Asp Asn Leu Asp Val Asn Arg Cys Ile Glu Ala Leu Asp Glu Leu
 20 25 30
 Ala Ser Leu Gln Val Thr Met Gln Gln Ala Gln Lys His Thr Glu Met
 35 40 45
 Ile Thr Thr Leu Lys Lys Ile Arg Arg Phe Lys Val Ser Gln Val Ile
 50 55 60
 Met Glu Lys Ser Thr Met Leu Tyr Asn Lys Phe Lys Asn Met Phe Leu
 65 70 75 80
 Val Gly Glu Gly Asp Ser Val
 85

25

ES 2 574 790 T3

<210> 8
 <211> 102
 <212> PRT
 <213> Artificial Secuencia

5

<220>
 <223> Sintética

10

<400> 8

```

Asp Ser Arg Leu Gln Arg Ile His Ala Glu Ile Lys Asn Ser Leu Lys
 1          5          10
Ile Asp Asn Leu Asp Val Asn Arg Cys Ile Glu Ala Leu Asp Glu Leu
          20          25          30
Ala Ser Leu Gln Val Thr Met Gln Gln Ala Gln Lys His Thr Glu Met
          35          40          45
Ile Thr Thr Leu Lys Lys Ile Arg Arg Phe Lys Val Ser Gln Val Ile
          50          55          60
Met Glu Lys Ser Thr Met Leu Tyr Asn Lys Phe Lys Asn Met Phe Leu
 65          70          75          80
Val Gly Glu Gly Asp Ser Val Ile Thr Gln Val Leu Asn Lys Ser Leu
          85          90          95
Ala Glu Gln Arg Gln His
          100
    
```

<210> 9
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Sintética

20

<400> 9

ES 2 574 790 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para aumentar la especificidad de un ensayo de enfermedad autoinmunitaria basado en anticuerpos que comprende las etapas de:
 - a. poner en contacto una muestra de suero o plasma con un antígeno derivado del moteado fino denso 70 (DFS70) para formar un complejo entre el antígeno derivado del DFS70 y los anticuerpos anti-DFS70 que pueden estar presentes en la muestra;
 - b. hacer reaccionar la muestra con una diana de la enfermedad autoinmunitaria; y
 - c. detectar los anticuerpos para la diana de la enfermedad autoinmunitaria.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ensayo de enfermedad autoinmunitaria basado en anticuerpos es una prueba de anticuerpos antinucleares (ANN).
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ensayo de enfermedad autoinmunitaria basado en anticuerpos se selecciona del grupo que consiste en un ensayo inmunoabsorbente fluorescente (EIF), un ensayo inmunoabsorbente quimioluminiscente (EIQ), un radioinmunoensayo (RIE), un inmunoensayo enzimático multiplicado, un radioinmunoensayo en fase sólida (RIEFS), un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el antígeno derivado del DFS70 es la SEQ ID NO: 1.
5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el antígeno derivado del DFS70 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9.
6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el antígeno derivado del DFS70 es un fragmento de la secuencia de aminoácidos del DFS70 (SEQ ID NO: 1).
7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el antígeno derivado del DFS70 se prepara diluyendo, en solución, antes de la etapa b, un antígeno derivado del DFS70.
8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la diana de la enfermedad autoinmunitaria es una molécula asociada con una enfermedad autoinmunitaria sistémica.
9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la diana de la enfermedad autoinmunitaria es una molécula asociada con una enfermedad del tejido conectivo.
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la enfermedad del tejido conectivo se selecciona del grupo que consiste en: lupus eritematoso sistémico (LES), polimiositis (PM), esclerosis sistémica y enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC).
11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la detección de los anticuerpos para la diana de la enfermedad autoinmunitaria es usando un marcador seleccionado del grupo que consiste en un fluorescente, una enzima, un quimioluminiscente, un fotosensibilizador y partículas suspendibles.
12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de poner en contacto la muestra de suero o plasma con un antígeno derivado del DFS70 para formar un complejo entre el antígeno derivado del DFS70 y los anticuerpos anti-DFS70 que pueden estar presentes en la muestra, bloquea la aparición de los autoanticuerpos anti-DFS70 en los resultados del ensayo de enfermedad autoinmunitaria basado en anticuerpos.
13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de poner en contacto la muestra de suero o plasma con un antígeno derivado del DFS70 para formar un complejo entre el antígeno derivado del DFS70 y los anticuerpos anti-DFS70 que pueden estar presentes en la muestra proporciona una identificación mejorada de otros anticuerpos en la muestra objeto.
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antígeno derivado del DFS70 se purifica de una fuente natural, se produce de forma recombinante o se prepara sintéticamente.

1 MTRDFKPGDL IFAKMKGYPH WPARVDEVDPD GAVKPPPTNKL PIFFFGTHET AFLGPKDIFP
 61 YSENKEKYGK PNKRKGFNEG LWEIDNPNKV KFSSQQAATK QSNASSDVEV EEKETSVSKE
 121 DTDHEEKASN EDVTKAVDIT TPKAARRGRK RKAEKQVETE EAGVTTATA SVNLKVSPPR
 181 GRPAATEVKI PKPRGRPKMV KQPCPSESDI ITEBDKSKKK GQEEKQPKKQ PKKDEEGQKE
 241 EDKPRKEPDK KEGKKEVESK RKNLAKTGVV STSDSEEEGD DQEGEKRRKG GRNFQTAHRR
 301 NMLKGQHEKE AADRKRKQEE QMETEQONKD EGKPEVKKV EKKRETSMDS RLQRIHAEIK
 361 NSLKIDNLDV NRCIEALDEL ASLQVTMQQA QKHTMITTL KIRRFKVSQ VIMEKSTMLY
 421 NKFKNMFVVG EGDVITQVL NKSLAEQRQH EEANKTKDQG KKGPNKKLEK EQTGSKTLNG
 481 GSDAQDGNQP QHNGESNEDS KDNHEASTKK KPSSEERETE ISLKDSTLDN

FIG. 1

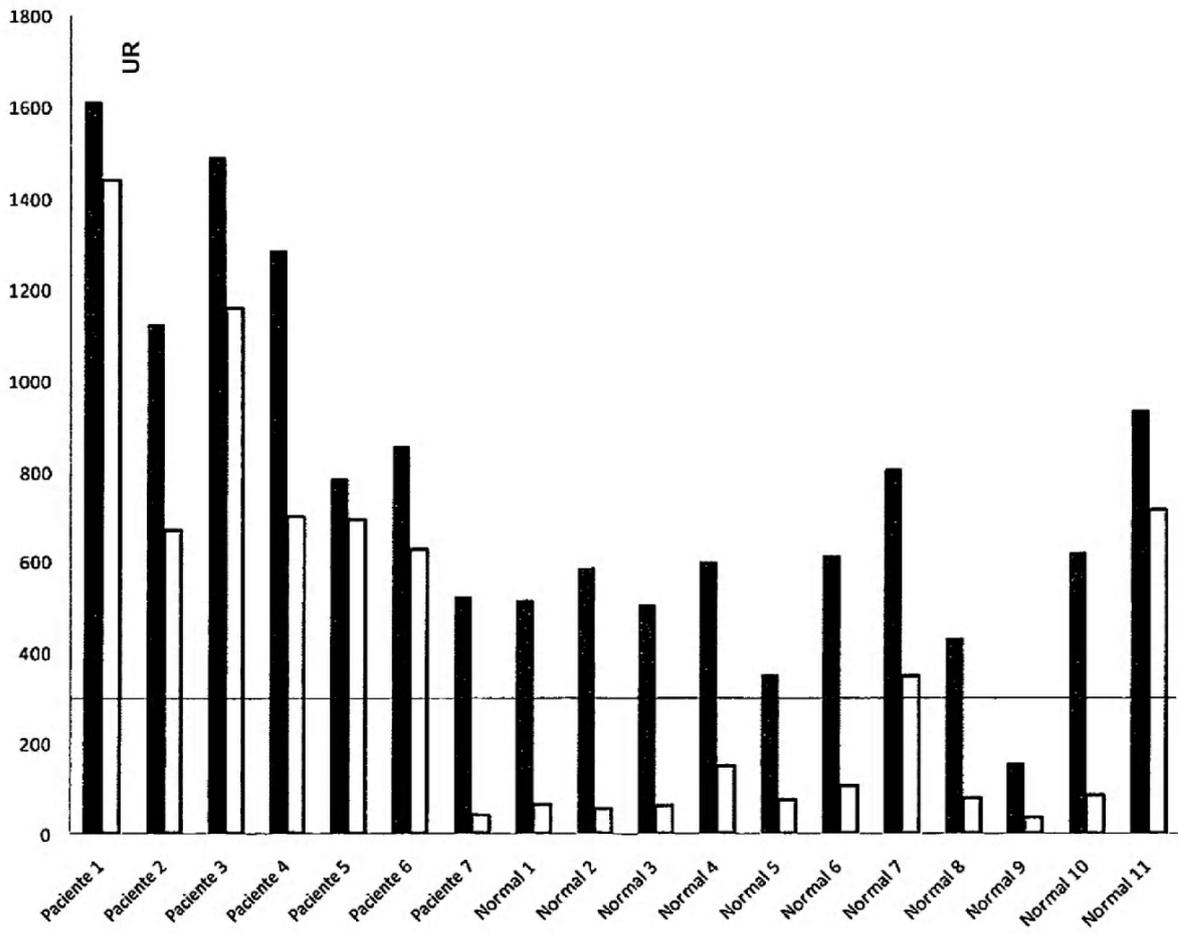


FIG. 2