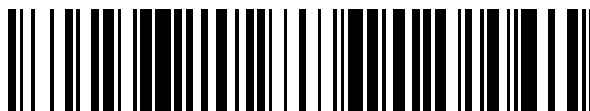


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 411**

51 Int. Cl.:

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/536 (2006.01)

G01N 33/561 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/559 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2010** **PCT/NZ2010/000183**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2011** **WO11034445**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2010** **E 10817490 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017** **EP 2478364**

54 Título: **Detección de autoanticuerpos contra antígenos nucleares**

30 Prioridad:

15.09.2009 AU 2009904459

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

26.10.2017

73 Titular/es:

GEMINI RESEARCH LIMITED (100.0%)
Raroa Accountants Limited, 1st Floor, 14 Laery
Street
Lower Hutt 2010 , NZ

72 Inventor/es:

COOK, NEIL JAMES

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 639 411 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

Detección de autoanticuerpos contra antígenos nucleares

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para detectar en una muestra un autoanticuerpo diana contra ciertos autoantígenos nucleares, usando un autoantígeno diana marcado con fluoróforo de molécula pequeña (AADMFMP) que se une específicamente con el autoanticuerpo diana. La invención también se refiere a usos de: AADMFMP, composiciones que comprenden el AADMFMP y kits que comprenden el AADMFMP.

Antecedentes

Trastornos autoinmunitarios

En individuos sanos normales, los linfocitos B que comprenden parte del sistema inmunitario humoral del cuerpo ayudan a proporcionar protección contra infección produciendo anticuerpos. Los anticuerpos son proteínas que atacan a microbios invasivos u otras sustancias "ajenas", eliminando esas sustancias del cuerpo y combatiendo de este modo la infección. Algunas sustancias ajenas son proteínas que provocan una respuesta inmunitaria; es decir, la producción de anticuerpos, y se denominan proteínas antigénicas, también denominadas en el presente documento, antígenos proteicos. Los anticuerpos producidos por el sistema inmunitario pueden ser altamente específicos en la unión y retirada de los antígenos particulares que provocan su producción. En los individuos con un sistema inmunitario de función normal, se acumulan a lo largo de tiempo una amplia diversidad de anticuerpos. Estos anticuerpos se dirigen a y reconocen diversos antígenos que se exponen al sistema inmunitario del cuerpo, identificando antígenos particulares como peligrosos o no peligrosos para el organismo.

Normalmente, el sistema inmunitario distingue fácilmente dos categorías generales, reconociendo proteínas antigénicas como "propias" o "no propias". El sistema inmunitario del cuerpo reconoce típicamente los antígenos propios como no peligrosos, aunque no siempre es así. El sistema inmunitario del cuerpo ataca típicamente solamente a los antígenos que reconoce como "no propios".

Los trastornos autoinmunitarios son enfermedades que resultan de la producción por parte del cuerpo de una respuesta inmunitaria e inapropiada dirigida contra sus antígenos propios. Dichas respuestas son frecuentemente dirigidas a tejidos o específicas de tejidos. Por ejemplo, el sistema inmunitario puede dejar de reconocer una o más de las proteínas normales del cuerpo como propias, creando anticuerpos denominados autoanticuerpos, que se dirigen a las células, tejidos y/u órganos del propio cuerpo. La inflamación y el daño producido por dichos ataques pueden conducir a diversos trastornos autoinmunitarios.

La causa específica de la enfermedad autoinmunitaria se desconoce. Algunas pruebas sugieren que ciertos individuos tienen una predisposición heredada a desarrollar enfermedad autoinmunitaria. Como alternativa, algunas enfermedades autoinmunitarias, (por ejemplo, fiebre reumática), parecen desencadenarse por infección bacteriana o vírica. La respuesta inmunitaria posterior produce anticuerpos o células T que atacan células normales que presentan ciertas proteínas que pueden asemejarse estructuralmente (al menos en parte) a la estructura de ciertas proteínas del microorganismo o los microorganismos infecciosos.

Los trastornos autoinmunitarios se clasifican en dos tipos generales. Son enfermedades autoinmunitarias sistémicas las enfermedades que provocan daño en muchos órganos. Son enfermedades autoinmunitarias localizadas, o específicas de tejido, las enfermedades que tan solo dañan directamente a un único órgano o tejido. Las distinciones entre estas dos categorías de enfermedad, sin embargo, no son absolutas. Frecuentemente, los efectos perjudiciales de trastornos autoinmunitarios localizados no están limitados a los efectos directos observados en un único órgano o tejido, y pueden extenderse indirectamente a otros órganos y sistemas del cuerpo.

Los tipos habituales de enfermedad autoinmunitaria incluyen Artritis Reumatoide (AR) y AR Juvenil (ARJ) (articulaciones; menos habitualmente pulmón, piel), Diabetes Mellitus de tipo 1 (islotos pancreáticos), Lupus [Lupus Eritematoso Sistémico] (piel, articulaciones, riñones, corazón, cerebro, glóbulos rojos, otros), Tiroiditis de Hashimoto, Enfermedad de Graves (tiroides), Esclerodermia (piel, intestino, menos habitualmente pulmón), Enfermedad Celíaca, Enfermedad de Crohn, Colitis Ulcerosa (tracto GI), Síndrome de Sjogren (glándulas salivales, glándulas lacrimales, articulaciones), Esclerosis Múltiple, Síndrome de Goodpasture (pulmones, riñones), Enfermedad de Addison (adrenal), Granulomatosis de Wegener (vasos sanguíneos, senos, pulmones, riñones), Cirrosis Biliar Primaria, Colangitis Esclerosante, Hepatitis Autoinmunitaria (hígado), Polimialgia Reumática (grupos musculares grandes), Arteritis Temporal/Arteritis de células gigantes (arterias de la cabeza y el cuello) y Síndrome de Guillain-Barre (sistema nervioso).

Diagnóstico de trastorno autoinmunitario

El diagnóstico de los trastornos autoinmunitarios se lleva a cabo generalmente mediante una combinación de análisis clínico de síntomas (presentación), ensayos sanguíneos para medir autoanticuerpos, inflamación y función de órganos y otros procedimientos incluyendo examen físico y/o rayos-X.

Se realizan típicamente ensayos sanguíneos que miden autoanticuerpos detectando autoanticuerpos presentes en una muestra de suero tomada de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un trastorno autoinmunitario. Los ensayos sanguíneos empleados habitualmente incluyen ensayos de inmunodifusión doble (IDD) de Ouchterlony y contrainmunolectroforesis (CIE). Estos tipos de ensayos visualizan precipitinas (aglutinaciones) de complejos de autoanticuerpo/antígeno formados por la unión de autoanticuerpos particulares con sus antígenos afines (Bunn y Kveder, 1993 *Man. Biol. Mark. Dis.* A3:1-12; Kluwer Academic). Pueden llevarse a cabo ensayos de IDD, por ejemplo, en placas de agar, con autoantígenos colocados en un pocillo central rodeados simétricamente por pocillos periféricos. Los pocillos periféricos se cargan después con muestras de ensayo que contienen anticuerpos que son diagnóstico para un trastorno autoinmunitario particular. Se permite que los antígenos de muestra y ensayo difundan a través de la agarosa, donde la aglutinación de los anticuerpos en la muestra con un autoantígeno afín conduce a la formación de un complejo de anticuerpo/antígeno. Se producirá reticulación extensiva tanto de anticuerpos y autoantígenos en el gel de agarosa en una localización en la que los autoanticuerpos en la muestra de ensayo y autoantígenos de los pocillos periféricos alcanzan concentraciones equivalentes debido a la difusión. Dichos complejos entrecruzados se denominan precipitinas. La formación de precipitina se visualiza después ópticamente por dispersión de luz directa del complejo de antígeno de ensayo/autoanticuerpo.

Debido a la especificidad de unión de un autoanticuerpo dado por su antígeno afín, los ensayos de IDD permiten la detección positiva de los autoanticuerpos presentes en la muestra que se ensaya. Los ensayos de IDD conocidos, sin embargo, no son cuantitativos y pueden padecer una falta relativa de sensibilidad. Además, se requieren en general números relativamente altos de autoanticuerpos en una muestra para visualización de precipitina. Por estas razones, los ensayos de IDD conocidos pueden producir resultados de falsos negativos en algunas circunstancias. La confirmación de un resultado negativo obtenido de un ensayo de IDD, a la vista de presentación clínica de síntomas relacionados con trastornos autoinmunitarios requiere realizar ensayos adicionales. Esto puede dar como resultado un gasto adicional, pérdida de tiempo antes del inicio de cualquier régimen de tratamiento e inconveniencia general para el sujeto.

Como alternativa, pueden detectarse autoanticuerpos presentes en una muestra usando una técnica bioquímica común denominada ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), o inmunoensayo enzimático (EIA) (Charles P.J. *et al.* 1993 *Man. Biol. Mark. Dis.* A5:1-23; Kluwer Academic). (Peene *et al.* 2001, *Ann Rheum Dis* 60: 1131-1136). En términos generales, los anticuerpos en una muestra pueden detectarse por ELISA de la siguiente manera:

Se fija una cantidad de un antígeno conocido que se une específicamente por un anticuerpo particular a una superficie, por ejemplo, el fondo de un pocillo de placa de microtitulación. Después se coloca en el pocillo una muestra que contiene una cantidad desconocida del anticuerpo para detectar, permitiendo la unión del antígeno con el anticuerpo. El anticuerpo unido se detecta después usando un conjugado de enzima anti-hIgG (inmunoglobulina G anti-humana).

Como alternativa, puede añadirse un sustrato para una enzima unida al anticuerpo al pocillo de la placa de microtitulación, donde la actividad de la enzima convierte ese sustrato en algún tipo de señal detectable. El anticuerpo puede unirse covalentemente con una enzima, o puede detectarse por sí mismo mediante el uso de un anticuerpo secundario ligado a enzima. La visualización de la señal detectable depende del sustrato enzimático empleado. Algunos ELISA utilizan sustratos cromogénicos, mientras que otros ensayos más sensibles emplean sustratos fluorogénicos. En el caso de ELISA de fluorescencia, la detección de fluorescencia de los complejos antígeno/anticuerpo permite inferir la cantidad de antígeno en la muestra midiendo la magnitud de la fluorescencia.

Un ELISA también puede usarse para detectar autoanticuerpos en una muestra sanguínea obtenida de un sujeto. Los métodos que emplean ELISA pueden detectar concentraciones muy bajas de autoanticuerpos en una muestra. Sin embargo, los métodos de ELISA de detección son propensos a falsos positivos debido a la extrema sensibilidad del ensayo.

En consecuencia, existe la necesidad de métodos alternativos de detección de autoanticuerpos en una muestra que se sospecha que contiene autoanticuerpos que pueden proporcionar a un especialista clínico una herramienta de diagnóstico más robusta disponible como un único ensayo. Un único ensayo podría proporcionar al especialista clínico mayor confianza en su diagnóstico sin incurrir en gastos adicionales para el sujeto de ensayos de confirmación adicionales, puede realizarse rápida y fácilmente, y también reducirá la inconveniencia para un sujeto de requerir ensayos adicionales, permitiendo potencialmente un inicio más temprano del régimen de tratamiento apropiado.

Es un objeto de la presente invención, por lo tanto, avanzar al menos algo hacia abordar las deficiencias de los ensayos de la técnica anterior como se ha perfilado anteriormente proporcionando métodos y/o composiciones y/o kits mejorados que pueden usarse para detectar autoanticuerpos y/o al menos proporcionar al público una opción útil.

La invención se ha ensayado en relación con varios autoantígenos diferentes, como se ve en la descripción posterior, en referencia particular a los ejemplos y la Figura 13.

La técnica anterior relevante se analiza en la página 49 de la descripción.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método para detectar un autoanticuerpo diana contra antígeno Jo-1, antígeno Ro60 SSA, antígeno La SSB, antígeno Sm, antígeno de complejos Sm/RNP o antígeno Scl-70 con una muestra, comprendiendo el método:

- i. poner en contacto la muestra con un autoantígeno diana marcado con fluoróforo de molécula pequeña (AADMFMP) que se une específicamente con dicho autoanticuerpo diana, y
 - ii. detectar la presencia del autoanticuerpo diana unido al AADMFMP por detección de fluorescencia,
- en el que el AADMFMP es un autoantígeno nuclear seleccionado del grupo que consiste en antígeno Jo-1, antígeno SSA (Ro60), antígeno SSB (La), antígeno Sm, antígeno de complejo Sm/RNP y antígeno Scl-70, en el que el componente fluoróforo del AADMFMP es menor de 5 kD.

Preferentemente el AADMFMP es, o deriva de, un autoantígeno que se asocia específicamente con un trastorno o enfermedad autoinmunitario particular.

Ese trastorno autoinmunitario puede seleccionarse del grupo que consiste en enfermedad de tejido conectivo mixto, lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de Sjogren, esclerodermia, polimiositis, esclerosis sistémica, dermatomiositis, artritis reumatoide y síndrome de lupus neonatal.

En una realización dicho AADMFMP es un autoantígeno diana marcado con fluorescencia aislado de un mamífero. Preferentemente el mamífero es un ser humano, mono, vaca, oveja, cerdo, rata o ratón. Preferentemente el mamífero es un ser humano, una oveja o una vaca. Más preferentemente el mamífero es una vaca.

En una realización dicho AADMFMP se prepara a partir de un autoantígeno diana que se ha aislado de una primera especie de mamífero, mientras que el autoanticuerpo diana que se une específicamente con el AADMFMP de la invención está presente en una muestra obtenida de una especie diferente de mamífero.

Preferentemente dicho AADMFMP se prepara a partir de un autoantígeno diana que se ha aislado de una vaca o una oveja. Más preferentemente, el autoantígeno diana se ha preparado a partir de una vaca. Preferentemente dicho AADMFMP preparado se usa para detectar un autoanticuerpo diana presente en una muestra obtenida de un ser humano.

En una realización dicho AADMFMP se prepara a partir de un autoantígeno diana del mismo que se ha expresado de forma recombinante a partir de una secuencia polinucleotídica que codifica el autoantígeno diana.

Preferentemente la secuencia polinucleotídica está comprendida en un vector de expresión.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un AADMFMP de acuerdo con la invención y un vehículo o diluyente.

En otro aspecto la invención proporciona kits para su uso en los métodos de la invención, comprendiendo el kit

- a) un AADMFMP de acuerdo con la invención;
- b) un dispositivo de inmunoensayo configurado para permitir que el AADMFMP de la invención entre en contacto con una muestra en condiciones que permitan que AADMFMP se una con un autoanticuerpo diana
- c) instrucciones para detectar el AADMFMP unido al autoanticuerpo diana.

Las instrucciones dirigen la detección de fluorescencia del AADMFMP.

El dispositivo de inmunoensayo es un dispositivo de inmunoprecipitación.

El contacto del autoanticuerpo diana con el AADMFMP se lleva a cabo en condiciones que permiten la inmunoprecipitación del AADMFMP con su autoanticuerpo diana.

Preferentemente el kit comprende un vehículo o diluyente para dicho AADMFMP. El AADMFMP puede disolverse en el vehículo diluyente o el vehículo diluyente puede estar presente por separado para preparación posterior de una composición de AADMFMP. Preferentemente el AADMFMP separado está liofilizado.

5 El kit es para su uso en un método para detectar un autoanticuerpo diana que comprende poner en contacto una muestra derivada de sangre obtenida de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad o un trastorno autoinmunitario con un AADMFMP de acuerdo con la invención y detectar la presencia del AADMFMP unido al autoanticuerpo diana por detección de fluorescencia.

10 Preferentemente la muestra derivada de sangre es una muestra de suero o plasma.

En una realización el sujeto presenta un fenotipo clínico que es indicativo o sugiere un trastorno autoinmunitario particular como se describe en el presente documento.

15 En una realización el kit es para su uso en un método de la invención o exploración de muestras clínicas obtenidas de sujetos como se describe en el presente documento, en el que el método se realiza simultáneamente con controles adecuados que carecen de autoanticuerpos diana o que contienen concentraciones conocidas de autoanticuerpos de control.

20 En una realización el contacto de la muestra con dicho AADMFMP se lleva a cabo por ensayo de inmunodifusión doble (IDD) o ensayo de contrainmunolectroforesis (CIE).

25 El contacto se lleva a cabo usando un dispositivo de inmunoprecipitación. Preferentemente el dispositivo de inmunoprecipitación es un dispositivo de microinmunodifusión o un dispositivo de contrainmunolectroforesis. Preferentemente el dispositivo de contrainmunolectroforesis es un dispositivo de microcontrainmunolectroforesis.

Preferentemente el ensayo de IDD es un ensayo de IDD asimétrico (IDDA). Preferentemente el ensayo de CIE es un ensayo de micro CIE.

30 Un método para diagnosticar una enfermedad o un trastorno autoinmunitario en un sujeto detectando un autoanticuerpo diana en una muestra obtenida del sujeto comprende:

a) poner en contacto la muestra con un AADMFMP de la invención, y

35 b) detectar la presencia del autoanticuerpo diana unido a AADMFMP por detección de fluorescencia.

El contacto en a) se lleva a cabo en condiciones que permiten la inmunoprecipitación del AADMFMP con el autoanticuerpo diana.

40 La detección en b) es detección en fluorescencia del AADMFMP en el inmunoprecipitado.

En una realización las condiciones que permiten la inmunoprecipitación del AADMFMP, con el autoanticuerpo diana son suficientes para permitir la difusión del autoanticuerpo diana y el AADMFMP, a través de un gel, preferentemente un gel de agarosa, hasta alcanzar concentraciones equivalentes en una localización particular donde se forma el inmunoprecipitado.

45 Preferentemente el gel de agarosa es de aproximadamente 0,3 % a aproximadamente 1,5 % de agarosa, más preferentemente el gel de agarosa es de aproximadamente 0,5 % a 1,2 % de agarosa. Más preferentemente el gel de agarosa es de 0,8 % a 1,0 % de agarosa.

50 En una realización el autoanticuerpo diana se detecta de acuerdo con un método de la invención en una muestra derivada de sangre obtenida de un sujeto a una dilución de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:256 (suero: diluyente).

55 Preferentemente la muestra derivada de sangre es una muestra de suero. Más preferentemente la dilución es de aproximadamente 1:8 a aproximadamente 1:128, es de aproximadamente 1:16 a aproximadamente 1:128, es de aproximadamente 1:32 a aproximadamente 1:128 o es de aproximadamente 1:64 a aproximadamente 1:128. Más preferentemente la dilución es de aproximadamente 1:128.

60 Se exponen en las reivindicaciones adjuntas aspectos adicionales de la invención.

Breve descripción de los dibujos

65 Se describirán ahora realizaciones preferidas de la invención en referencia a las figuras en los dibujos adjuntos solamente como ejemplo. Debe entenderse que la invención no se limita a las mismas. Durante el resto de la descripción SSA como se usa en el presente documento se refiere a antígeno (Ro60) purificado.

Figura 1: Marcaje fluorescente de antígeno SSA (Ro60)

Comparación de antígeno SSA marcado y no marcado visualizada de la siguiente manera: A) después de electroforesis de SDS por tinción con azul de Coomassie; B) después de electroforesis de SDS por transiluminación de luz azul con filtro ámbar; C) después de electroforesis de SDS y electrotransferencia por inmunotransferencia usando autoanticuerpos humanos específicos para SSA.

Figura 2: Unión de antígeno SSA marcado frente a no marcado como se evalúa por ELISA

Una gráfica que muestra la capacidad de unión de antígeno SSA marcado con fluorescencia de moléculas pequeñas (AlexaFluor 488) y no marcado para unirse con los autoanticuerpos objeto como se determina por ELISA. Concentración de revestimiento de antígeno: ♦ = 1,0 µg/ml; ● = 0,5 µg/ml; x = 0,25 µg/ml.

Figura 3: Detección de anticuerpos anti-SSA por inmunodifusión doble (IDD).

Visualización de fluorescencia de anticuerpos anti-SSA en suero obtenido de un sujeto (pocillos 1-6) por ensayo de inmunodifusión doble. La concentración de suero se reduce de los pocillos 1 a 6. La concentración de SSA marcado con fluorescencia de molécula pequeña usado para detectar los anticuerpos anti-SSA (pocillo central) aumenta de izquierda a derecha.

Figura 4: Comparación de métodos de detección anti-SSA usando inmunodifusión doble

Se detecta anti-SSA en suero obtenido de un sujeto usando SSA marcado con fluorescencia de molécula pequeña y se visualiza por detección de fluorescencia o epiiluminación de luz blanca frente a un fondo negro. A) transiluminación de luz azul con filtro ámbar; B) epiiluminación de luz blanca frente a un fondo negro.

Figura 5: Evaluación semicuantitativa de inmunodifusión doble fluorescente

Exploración de imágenes densitométricas de la banda de precipitina formada por la unión de SSA marcado con fluorescencia de moléculas pequeñas/anti-SSA.

Figura 6: Detección de anticuerpos anti-SSA: comparación de inmunodifusión doble y ELISA

Una representación grafica de la unión de anti-SSA/SSA marcado con fluorescencia de molécula pequeña determinada por ELISA directo y por inmunodifusión doble. Representación de la puntuación de inmunodifusión doble y absorbancia de ELISA ilustra una buena correlación ($r^2=0,7107$) entre los dos métodos de medición de autoanticuerpos de SSA.

Figura 7: Especificidad de detección de diferentes antiautoantígenos nucleares extraíbles (ANE)

Ensayos de inmunodifusión doble de la invención que muestran detección de fluorescencia de seis autoanticuerpos diferentes en muestras de suero obtenidas de un sujeto usando autoantígenos marcados con fluorescencia de moléculas pequeñas de acuerdo con la invención. Autoanticuerpos: pocillo 1, anti-SSA y anti-SSB; Pocillo 2, donante sano (sin autoanticuerpos); Pocillo 3, anti-Jo-1; Pocillo 4, anti-RNP/Sm; Pocillo 5, anti-Sm; Pocillo 6, anti-Scl-70. Autoantígenos marcados con fluorescencia de moléculas pequeñas: A) SSA; B) SSB; C) Jo-1; D) RNP/Sm; E) Sm y F) Scl-70,

Figura 8: Detección contra inmunoelectroforética de autoanticuerpos anti-ANE usando autoantígenos marcados con fluorescencia de moléculas pequeñas

Detección de fluorescencia de precipitinas de anticuerpo anti-ANE/autoantígeno marcado con fluorescencia de moléculas pequeñas por contrainmunolectroforesis. Formación de precipitina detectada por transiluminación de luz azul con filtro ámbar mostrada para un donante sano (negativo) y tres muestras del sujeto con autoanticuerpos específicos para cada autoantígeno identificadas en la columna izquierda.

Figura 9:

Formatos de microdifusión doble experimental para la detección de precipitación de autoanticuerpos usando autoantígenos marcados con fluorescencia: a) formato de microinmunodifusión doble; B) formato de microcontrainmunolectroforesis.

Figura 10:

Método para preparación de geles de agarosa para su uso en CIE. Se aplica agarosa líquida caliente al área rebajada del molde mostrado en (A). Se superpone una película de soporte (GelBond-Lonza, Maryland, Estados Unidos) sobre la agarosa. La agarosa solidificada se adhiere al GelBond, que se desprende del molde, permitiendo que se use el gel.

Figura 11:

Ciclo temporal para la detección de autoanticuerpos por CIE. Gel de DIE que muestra la detección de autoanticuerpos anti-SSA en el suero del paciente a lo largo del tiempo. La electroforesis fue a una corriente constante de 3 mA. El gel se visualiza a los intervalos temporales indicados usando transiluminación de luz azul con un filtro ámbar.

Figura 12:

Detección de autoanticuerpos a diferentes diluciones en suero usando CIE. Los autoanticuerpos anti-SSA se detectan a partir de una serie de diluciones de suero del paciente. Los autoanticuerpos se detectan a las diluciones ensayadas. La electroforesis fue a una corriente constante de 3 mA. El gel se visualizó a los intervalos temporales indicados usando transiluminación de luz azul con un filtro ámbar.

Figura 13:

Detección de autoanticuerpos específicos para seis antígenos nucleares diferentes. Se muestra la detección por CIE de autoanticuerpos anti-SSA, SSA/SB, Scl-70, Jo-1, Sm y RNP. La electroforesis fue a una corriente constante de 3 mA. Los geles se visualizaron después de 60 minutos usando transiluminación de luz azul con un filtro ámbar.

Descripción detallada de la invención

En la descripción en la presente memoria descriptiva se puede hacer referencia a materia objeto que puede no estar dentro del alcance de las reivindicaciones de la presente solicitud. Esa materia objeto debería ser fácilmente identificable por un experto en la materia y puede ayudar a poner en práctica la invención como se define en las reivindicaciones de la presente solicitud.

Definiciones

El término "antígeno" se refiere a cualquier sustancia, incluyendo pero sin limitación una toxina, enzima o proteína, que estimule una respuesta inmunitaria en el cuerpo, especialmente la producción de anticuerpos. Un "antígeno diana", como se usa en el presente documento se refiere a un antígeno que contiene al menos un epítipo que se une específicamente con un anticuerpo diana particular.

Un "autoantígeno" como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier constituyente de cuerpo endógeno que estimule la producción de autoanticuerpos y una reacción autoinmunitaria. Un autoantígeno también se denomina "antígeno propio" como se conoce y se usa en la técnica. Un "autoantígeno diana" se refiere a cualquier constituyente de cuerpo endógeno que ha estimulado la producción de un autoanticuerpo particular y que contiene al menos un epítipo con el que se une específicamente el autoanticuerpo diana.

Como se usa en el presente documento no es necesario que un anticuerpo diana y antígeno diana, incluyendo autoanticuerpos diana y autoantígenos diana sean de la misma especie de organismo. Lo que es necesario es que el antígeno diana y el anticuerpo diana se unan específica y selectivamente entre sí, en los que los antígenos diana contienen al menos un epítipo con el que se unen específicamente los anticuerpos diana. Por ejemplo, un antígeno diana o autoantígeno diana de acuerdo con la invención puede obtenerse de una vaca o un ratón, mientras que el anticuerpo diana puede detectarse de una muestra obtenida de un ser humano.

Las expresiones "anticuerpo afín" y "antígeno afín" (incluyendo autoantígeno afín) como se usan en el presente documento se refieren a anticuerpos diana y antígenos diana que se unen específica y selectivamente entre sí. Como se usa en el presente documento, no es necesario que los anticuerpos afines y antígenos afines sean de la misma especie de organismo. Lo que es necesario es que el antígeno afín o autoantígeno afín se unan específica y selectivamente con sus anticuerpos afines y autoanticuerpos afines respectivos, en los que los anticuerpos afines y autoanticuerpos afines contienen al menos un epítipo con el que se unen específicamente los antígenos afines y autoantígenos afines. Por ejemplo, un antígeno afín o autoantígeno afín de acuerdo con la invención puede obtenerse de una vaca, una oveja o un ratón y usarse para detectar, de acuerdo con la invención, un anticuerpo afín o autoanticuerpo afín presente en una muestra obtenida de un ser humano.

Un "autoantígeno nuclear" como se usa en el presente documento se refiere a un autoantígeno que está al menos parcialmente localizado en el núcleo de células eucariotas.

Un "autoantígeno nuclear extraíble" (ANE) se refiere a un autoantígeno que puede extraerse a una fase líquida, típicamente usando alta concentración salina, de los núcleos de células eucariotas.

El término "anticuerpo" (incluyendo anticuerpo diana y autoanticuerpo diana) se refiere a una molécula de inmunoglobulina que tiene una estructura específica que interacciona (se une) específicamente con una molécula que comprende el antígeno usado para sintetizar el anticuerpo o con un antígeno estrechamente relacionado con ella. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye en líneas generales anticuerpos de longitud completa y también puede incluir ciertos fragmentos de anticuerpo de los mismos. También se incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos multivalentes y monovalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos que tienen afinidad madurada.

Un "antígeno diana" que se une "selectiva o específicamente" con un "anticuerpo diana" de acuerdo con la invención es un antígeno que se une preferentemente con el anticuerpo diana, por ejemplo, tiene menos de 25 %, o menos de

10 %, o menos de 1 % o menos de 0,1 % de reactividad cruzada con un anticuerpo no diana. Habitualmente, un anticuerpo diana tendrá una afinidad de unión (valor de constante de disociación (K_d)), por el antígeno o epítipo de no más de 10^{-6} o de 10^{-7} M, preferentemente menos de aproximadamente 10^{-8} M, más preferentemente menos de aproximadamente 10^{-9} M, 10^{-10} , 10^{-11} o 10^{-12} M. La afinidad de unión puede evaluarse usando resonancia de plasmón superficial [véase por ejemplo documentos US7531639 o US6818392, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia].

En consecuencia, un autoantígeno diana marcado con fluorescencia de molécula pequeña (AADMFP) de o útil en la invención es uno que se une selectiva o específicamente con un "autoanticuerpo diana". Un "fragmento de unión a antígeno" o "fragmento de anticuerpo" (incluyendo anticuerpo diana o fragmento de unión a antígeno diana) se refiere a una parte del anticuerpo intacto que conserva preferentemente la mayoría de o todas, o mínimamente al menos una de, las funciones normales de ese fragmento de anticuerpo. Un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, puede comprender una región Fc que conserva toda o la mayoría o algo de la función de la región Fc correspondiente del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales, diacuerpos, anticuerpos monocatenarios (ScFV) y anticuerpos mutiespecíficos.

Un "anticuerpo monoclonal" (incluyendo un anticuerpo diana o autoanticuerpo diana) significa un anticuerpo que es un anticuerpo altamente específico dirigido contra un único epítipo en el antígeno diana. Un anticuerpo monoclonal puede obtenerse de una población de anticuerpos homogéneos o sustancialmente homogéneos en los que cada anticuerpo monoclonal es idéntico y/o se une con el mismo epítipo, excepto por mutaciones naturales que pueden aparecer en cantidades menores.

Un "anticuerpo aislado" (incluyendo un anticuerpo diana aislado o autoanticuerpo diana aislado) es un anticuerpo identificado que se ha separado o recuperado, o ambos, de un componente de su ambiente natural. Por ejemplo, anticuerpos que se separan de proteínas, incluyendo enzimas y hormonas o cualquier otro constituyente del cuerpo, incluyendo constituyentes celulares y tisulares. En una realización, el anticuerpo se purifica hasta al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % en peso del anticuerpo. Se cree que se conocen en la técnica y están disponibles fácilmente para los expertos en la materia métodos adecuados para determinar la pureza de un anticuerpo o autoanticuerpo aislado. Habitualmente el anticuerpo se preparará por al menos una etapa de purificación.

Un "fragmento funcional, variante funcional o derivado funcional" de un AADMFP de acuerdo con la invención es un autoantígeno marcado que está compuesto por cualquier subsecuencia de restos de aminoácidos contiguos que es capaz de unirse específica y selectivamente con un autoanticuerpo diana como se describe en el presente documento. La unión del autoanticuerpo diana da como resultado la formación de un inmunoprecipitado (precipitina). Típicamente dichos fragmentos tienen al menos 10, preferentemente al menos 15, más preferentemente al menos 20 aminoácidos.

Una "muestra derivada de sangre" significa cualquier muestra derivada de la sangre del sujeto para explorar. La muestra puede ser cualquier muestra conocida en la técnica en la que el autoanticuerpo diana puede detectarse. Se incluyen muestras de cualquier sujeto tal como de sujetos sanos normales sin historial clínico de trastornos autoinmunitarios como se describe en el presente documento. Las muestras derivadas de sangre incluyen, por ejemplo, muestras de suero y plasma y otros tipos de muestras, pero sin limitarse a las mismas.

Un nivel "mayor" o "menor" que un control, o un cambio o desviación de un control en una realización es estadísticamente significativo. Puede considerarse que existe un nivel mayor, nivel menor, desviación de, o cambio desde un nivel de control o nivel de control medio si el nivel difiere del nivel de control en 5 % o más, en 10 % o más, en 20 % o más o en 50 % o más en comparación con el nivel de control. La significación estadística puede calcularse como alternativa como $P \leq 0,05$. En una alternativa adicional, los niveles mayores, niveles menores, la desviación y los cambios pueden determinarse haciendo uso de límites de referencia o intervalos de referencia del ensayo. Estos pueden calcularse a partir de una evaluación intuitiva o métodos no paramétricos. En general, estos métodos calculan los fractiles 0,025 y 0,975 como $0,025 * (n+1)$ y $0,975 * (n+1)$. Dichos métodos se conocen bien en la técnica (Hunt *et al.*, 1997 Clin. Endocrinol. 47: 287-296; The Immunoassay Handbook. 3ª edición, ed. David Wild. Elsevier Ltd, 2005).

La presencia de un autoanticuerpo diana que está ausente en un control también se contempla como un nivel mayor, una desviación o un cambio. La ausencia de un autoanticuerpo diana que está presente en un control también se contempla como un nivel menor, una desviación o un cambio.

Una "cantidad estadísticamente significativa" como se usa en el presente documento describe una medida matemática de la diferencia entre grupos. Se dice que la diferencia es estadísticamente significativa si es mayor que lo que podría esperarse que se produjera solamente al azar.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse específicamente con una inmunoglobulina y/o un receptor de células T, que es un sitio en un antígeno al que responden las células B y/o T. Los determinantes epitópicos habitualmente consisten en agrupamientos de superficie químicamente activa de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares, y habitualmente tienen características

estructurales tridimensionales específicas y características de carga específicas. Un epítipo incluye típicamente 3, 5 o habitualmente 8-10 aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser aminoácidos contiguos o no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario.

Como se usa en el presente documento un autoantígeno marcado con fluoróforo de molécula pequeña (AADMFMP) es uno de los autoantígenos diana como se define en el presente documento seleccionado del grupo que consiste en antígeno Jo-1, antígeno Ro60 SSA, antígeno La SSB, antígeno Sm, antígeno de complejo Sm/RNP y antígeno Scl-70 que se han marcado con un fluoróforo de molécula pequeña en el que los fluoróforos de moléculas pequeñas son detectables por la emisión de fluorescencia de la molécula pequeña tras la excitación de la molécula pequeña con la longitud de onda de luz apropiada.

Dentro del contexto de un AADMFMP de acuerdo con la invención, la expresión "molécula pequeña" se refiere a un compuesto que tiene una masa molecular igual a o menor de 5.000 Daltons (5 kD), preferentemente menor de 3 kD, aún más preferentemente menor de 2 kD, y más preferentemente menor de 1 kD. En algunos casos es altamente preferido que una molécula pequeña tenga una masa molecular igual a o menor de 700 Da. Una clase de antígenos diana marcados con fluoróforos de moléculas pequeñas, que son particularmente útiles de acuerdo con la invención, son conjugados de antígeno diana marcados con FITC como se conocen habitualmente y se usan en la técnica. Los fluoróforos útiles adicionales con propiedades espectrales similares incluyen los que tienen una longitud de onda de excitación de 494 nm y una longitud de onda de emisión de 518 nm, pero sin limitarse a los mismos.

Los fluoróforos adicionales que pueden ser útiles de acuerdo con la invención incluyen otros fluoróforos como se conocen habitualmente y se usan en la técnica, incluyendo pero sin limitación los enumerados en la Tabla 1.

Tabla 1

Fluoróforo	Excitación [nm]	Emisión [nm]
5-hidroxitriptamina (HAT)	370-415	520-540
Acridine yellow	470	550
Acridine orange	500	530
Alexa Fluor 488	494	519
Alexa Fluor 532	530	555
Alexa Fluor 546	554	570
BODIPY 500/510	508	515
BODIPY 530/550	534	554
Cascade Blue	375	410
Cumarina	384	470
CY2	489	506
CY3	548	562
CY5	650	670-700
Dansilo	340	520
DAPI	345	458
DPH	354	430
Eritrosina	529	554
Bromuro de etidio	510	595
FITC	494	518
Fluoresceína	495	517
FURA-2	340/380	500/530
GFP	395/489	509
Hoechst33258	365	480

Fluoróforo	Excitación [nm]	Emisión [nm]
Hoechst33342	355	465
Laurdan	364	497
Lucifer yellow CH	428	535
Nile Red	485	525
Oregon Green 488	493	520
Oregon Green 500	503	522
Oregon Green 514	511	530
Prodan	361	498
Pireno	341	376
Rodamina 110	496	520
Rodamina 123	505	534
Rodamina 6G	525	555
Rodamina B	540	625
SITS	336	438
SNARF	480	600/650
Estilbeno SITS, SITA	365	460
Texas Red	589	615
TOTO-1	514	533
YOYO-1	491	509
YOYO-3	612	631

La expresión "asociado específicamente con un trastorno autoinmunitario particular" cuando se usa en referencia a un autoantígeno como se describe en el presente documento se refiere a un autoantígeno que se sabe en la técnica que provoca la producción por el sistema inmunitario del cuerpo de un autoanticuerpo que se une específica o selectivamente con al menos un epítipo del autoantígeno.

La expresión "asociado específicamente con un trastorno autoinmunitario particular" cuando se usa en referencia a un autoanticuerpo como se describe en el presente documento se refiere a un autoanticuerpo que se conoce en la técnica que es producido por el sistema inmunitario del cuerpo, en respuesta a un autoantígeno como se conoce en la técnica o se describe en el presente documento, que se une específica o selectivamente, en al menos un epítipo con el autoanticuerpo.

Un trastorno o una enfermedad autoinmunitaria es un trastorno o una enfermedad que resulta de la producción por parte del cuerpo de una respuesta inmunitaria inapropiada dirigida contra sus "antígenos propios". Dichas respuestas pueden ser dirigidas a células o tejidos o específicas de células o tejidos. En particular, el sistema inmunitario puede dejar de reconocer una o más de las proteínas normales del cuerpo como "propias", creando autoanticuerpos como se describe en el presente documento o como se conoce en la técnica, que se dirigen a las propias células, tejidos y/u órganos del cuerpo. La inflamación y/o el daño que resulta de dichos ataques puede considerarse causante de diversos trastornos autoinmunitarios.

Por ejemplo, un trastorno autoinmunitario puede resultar de una respuesta inmunitaria en un individuo sano normal que produce anticuerpos o células T que atacan células o tejidos normales que presentan proteínas normalmente producidas en el cuerpo por individuos sanos normales. Antes de esta respuesta inmunitaria inapropiada, dichos individuos no presentan ningún fenotipo clínico asociado con o que sea diagnóstico para una enfermedad o un trastorno autoinmunitario.

Los trastornos autoinmunitarios pueden clasificarse en enfermedades autoinmunitarias sistémicas y enfermedades autoinmunitarias localizadas. Las enfermedades sistémicas provocan daño a muchos órganos mientras que las enfermedades localizadas son las que dañan directamente solamente un único órgano o tejido. No hay, sin embargo, ninguna distinción clara y absoluta entre estos dos tipos de enfermedad autoinmunitaria. Es habitual que

los efectos directos de enfermedad autoinmunitaria localizada en un único órgano o tejido se extiendan indirectamente a otros órganos y sistemas del cuerpo.

Como se usa en el presente documento, "enfermedad o trastorno autoinmunitario" es una afección que se produce cuando el sistema inmunitario ataca y destruye erróneamente tejido corporal sano. Existen más de 80 tipos diferentes de trastornos autoinmunitarios diferentes.

La expresión "trastorno autoinmunitario" como se usa en el presente documento incluye, pero sin limitación, las siguientes enfermedades o trastornos incluyendo encefalomiелitis diseminada aguda (EMDA), leucoencefalitis hemorrágica necrotizante aguda, enfermedad de Addison, agammaglobulinemia, asma alérgica, rinitis alérgica, alopecia areata, amiloidosis, espondilitis anquilosante, nefritis anti GBM/anti TBM, síndrome antifosfolípido (SAP), anemia aplásica autoinmunitaria, disautonomía autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, hiperlipidemia autoinmunitaria, inmunodeficiencia autoinmunitaria, enfermedad del oído interno autoinmunitaria (EOIA), miocarditis autoinmunitaria, pancreatitis autoinmunitaria, retinopatía autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (PTA), enfermedad de tiroides autoinmunitaria, neuropatías axónicas y neuronales, enfermedad de Baló, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, enfermedad de Castleman, esprúe celíaco (no tropical), enfermedad de Chagas, síndrome de fatiga crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC), osteomielitis multifocal recurrente crónica (OMRC), síndrome de Churg-Strauss, penfigoide mucoso benigno/penfigoide cicatricial, enfermedad de Crohn, síndrome de Cogan, enfermedad de aglutinina fría, bloqueo cardíaco congénito, miocarditis de Cocksackie, enfermedad de CREST, crioglobulinemia mixta esencial, neuropatías desmielinizantes, dermatomiositis, enfermedad de Devic (neuromielitis óptica), lupus discoide, síndrome de Dressler, endometriosis, fascitis eosinófila, eritema nudoso, encefalomiелitis alérgica experimental, síndrome de Evans, fibromialgia, alveolitis fibrosante, arteritis de células gigantes (arteritis temporal), glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, púrpura de Henoch-Schonlein, herpes gestacional, hipogammaglobulinemia, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), nefropatía de IgA, lipoproteínas inmunorreguladoras, miositis de cuerpos de inclusión, diabetes insulino dependiente (de tipo I), cistitis intersticial, artritis juvenil, diabetes juvenil, síndrome de Kawasaki, síndrome de Lambert-Eaton, vasculitis leucocitoclástica, liquen plano, liquen escleroso, conjuntivitis línea, enfermedad de IgA lineal (EAL), lupus (LES), enfermedad de Lyme, enfermedad de Meniere, poliangiitis microscópica, enfermedad de tejido conectivo mixto (ETCM), úlcera de Mooren, enfermedad de Mucha-Habermann, esclerosis múltiple, miastenia grave, miositis, narcolepsia, neuromielitis óptica, (véase Devic), neutropenia, penfigoide cicatricial ocular, neuritis óptica, reumatismo palindrómico, PANDAS (trastornos neuropsiquiátricos autoinmunitarios pediátricos asociados con estreptococo), degeneración cerebelar paraneoplásica, hemoglobinuria nocturna paroxística (HNP), síndrome de Parry Romberg, síndrome de Parsonage-Turner, pars planitis (uveítis periférica), pénfigo, neuropatía periférica, encefalomiелitis perivenosa, anemia perniciosa, síndrome de POEMS, poliarteritis nudosa, síndromes poliglandulares autoinmunitarios de tipo I, II y III, polimialgia reumática, polimiositis, síndrome de postinfarto miocárdico, síndrome postpericardiotomía, dermatitis de progesterona, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fibrosis pulmonar idiopática, piodermia gangrenosa, aplasia de glóbulos rojos pura, 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, esclerodermia, síndrome de Sjogren, autoinmunidad espermiática y testicular, síndrome de la persona rígida, endocarditis bacteriana subaguda (EBS), oftalmía simpática, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, púrpura trombocitopénica (PTT), síndrome de Tolosa-Hunt, mielitis transversal, colitis ulcerosa, enfermedad de tejido conectivo indiferenciada (ETCI), uveítis, vasculitis, dermatosis vesiculoampollosa, vitíligo y granulomatosis de Wegener. Preferentemente el trastorno autoinmunitario es al menos uno de, pero sin limitación, los siguientes tipos habituales de trastornos autoinmunitarios incluyendo artritis reumatoide (AR) y AR juvenil (ARJ) (articulaciones; menos habitualmente pulmón, piel), diabetes mellitus de tipo 1 (islotes pancreáticos), lupus [lupus eritematoso sistémico] (piel, articulaciones, riñones, corazón, cerebro, glóbulos rojos, otros), tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves (tiroides), esclerodermia (piel, intestino, menos habitualmente pulmón), enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa (tracto GI), síndrome de Sjogren (glándulas salivales, glándulas lacrimales, articulaciones), esclerosis múltiple, síndrome de Goodpasture (pulmones, riñones), enfermedad de Addison (adrenal), granulomatosis de Wegener (vasos sanguíneos, senos, pulmones, riñones), cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmunitaria (hígado), polimialgia reumática (grupos musculares grandes), arteritis temporal/arteritis de células gigantes (arterias de la cabeza y del cuello) y síndrome de Guillain-Barre (sistema nervioso).

Como se usa en el presente documento, un vehículo o diluyente de, o útil en, la invención es cualquier vehículo o diluyente adecuado como se conoce y usa en la técnica en el que puede resuspenderse el AADMFMP de la invención para su uso.

En una realización particular el vehículo o diluyente puede ser un tampón que es adecuado para su uso en un ensayo de IDD de acuerdo con métodos de la invención como se describe en Bunn *et al.* 1993 Man. Biol. Mark. Dis. A3: 1-12 (Kluwer Academic). El tampón puede ser cualquier tampón adecuado como se conoce y usa en la técnica que tenga una fuerza iónica razonable, por ejemplo, NaCl de 0,1 a 1,0 M, preferentemente NaCl de 0,2 a 0,8 M, preferentemente NaCl de 0,3 a 0,6 M, preferentemente NaCl 0,4 M, pero sin limitación.

En una realización no limitante, el vehículo o diluyente puede ser un tampón que comprenda uno o todos de los siguientes componentes en cantidades adecuadas: un detergente (por ejemplo Tween 20), albúmina, un conservante (por ejemplo, azida sódica), un antioxidante (por ejemplo, ditiotreitól), opcionalmente otras sales (incluyendo cloruros de potasio, magnesio, amonio, etc.) y opcionalmente glicerol.

El glicerol también es útil para la estabilización de componentes antigénicos en un kit, por ejemplo. Se cree que la formulación de un tampón, vehículo o diluyente apropiado está dentro de la experiencia de la técnica.

El término "lío-filizar" (incluyendo liofilizado, liofiliza, etc.) (también conocido como criodesecación) como se usa en el presente documento se refiere a un proceso de deshidratación típicamente usado para conservar un material perecedero o hacer el material más conveniente para su transporte. En consecuencia, un AADMFMP de acuerdo con la invención puede liofilizarse para aumentar la estabilidad y el tiempo de almacenamiento, por ejemplo retirando el agua del material y sellando en material en un vial, pero sin limitación. El material puede después fácilmente almacenarse, enviarse y después reconstituirse a su forma original para su uso en un método de acuerdo con la invención.

La "inmunoprecipitación" como se usa en el presente documento se refiere a la técnica de precipitación de un anticuerpo de la solución usando un antígeno que se une específica o selectivamente con ese anticuerpo particular.

Además la inmunoprecipitación también se refiere a precipitar un antígeno haciéndolo reaccionar con un anticuerpo específico y añadiendo después un reactivo de fase sólida (típicamente proteína A acoplada a perlas de agarosa) que conducirán a la sedimentación del complejo antígeno-anticuerpo.

En particular, una inmunoprecipitación de acuerdo con la invención es la precipitación de un autoanticuerpo diana, debido a la unión específica o selectiva de un autoantígeno diana, con el autoanticuerpo diana, en un complejo reticulado. La formación del complejo reticulado se produce en una interfaz formada por la difusión del autoanticuerpo diana y el autoantígeno diana a través de una matriz de gel, preferentemente una matriz de gel de agarosa, debido a la presencia de concentración equivalente del autoanticuerpo diana y autoantígeno diana.

Los términos "inmunoprecipitado" y "precipitina" se usan indistintamente y significan el complejo de autoanticuerpos diana reticulados y autoantígenos diana reticulados que se forman como resultado de una inmunoprecipitación.

Como se usa en el presente documento, un dispositivo de inmunoprecipitación se refiere a cualquier dispositivo que se configure para permitir que los autoantígenos afines y sus autoanticuerpos afines respectivos como se describe en el presente documento reaccionen en condiciones adecuadas para formar un inmunoprecipitado o precipitina.

Un dispositivo de microinmunodifusión como se usa en el presente documento se refiere a un dispositivo de inmunoprecipitación configurado para permitir que los autoantígenos afines y sus autoanticuerpos afines respectivos como se describe en el presente documento reaccionen en condiciones adecuadas para formar un inmunoprecipitado o precipitina. En un ejemplo, un dispositivo de microinmunodifusión comprende un cuerpo, que puede ser, pero sin limitación, un portaobjetos de microscopio modificado que tiene un pocillo primario que contiene un medio de difusión de gel a través del que puede difundir un autoanticuerpo diana y autoantígeno diana para formar un inmunoprecipitado. Preferentemente el medio de difusión de gel es un medio de difusión de gel de agarosa, pero sin limitación. El pocillo primario comprende una serie de pocillos secundarios que están configurados para aceptar muestras de ensayo y AADMFMP de la invención. La configuración de los pocillos en combinación con la fuerza del gel y la concentración del tampón del medio de difusión de gel permite la difusión de la muestra de ensayo y los AADMFMP a través del medio de difusión de gel para formar una precipitina. La formación de precipitina se produce en una interfaz en la que las concentraciones de los anticuerpos para detectar (incluyendo autoanticuerpos) y los AADMFMP de acuerdo con la invención estén presentes a concentraciones equivalentes.

"Contrainmuno-electroforesis" (CIE) se refiere a una técnica de laboratorio que emplea una corriente eléctrica para acelerar la migración de anticuerpo y antígeno a través de un medio de difusión de gel tamponado. Los autoantígenos en un medio de difusión de gel tamponado que tiene un pH controlado, tienen carga fuertemente negativa, mientras que los autoanticuerpos en el mismo medio tienen menos carga negativa. Preferentemente el medio de difusión de gel es un medio de difusión de gel de agarosa, pero sin limitación. Tras la aplicación de una corriente eléctrica adecuada, los antígenos migrarán rápidamente a través del campo eléctrico hacia el ánodo, mientras que los anticuerpos migrarán en la dirección opuesta o "contraria" hacia el cátodo. La formación de precipitina se producirá cuando los anticuerpos y sus antígenos afines se combinen para formar un complejo reticulado.

En una realización de acuerdo con la invención, las muestras de suero de ensayo obtenidas de sujetos que tienen o se sospecha que tienen un trastorno autoinmunitario, se colocan en los pocillos del ánodo de un gel comprendido en, o parte de, un dispositivo de ensayo de CIE. El dispositivo de ensayo de CIE es un tipo de dispositivo de inmunoprecipitación como se describe en el presente documento. Las muestras de ensayo se someten a electroforesis a una tensión adecuada durante un periodo de tiempo específico para permitir que los autoanticuerpos presentes en las muestras de ensayo se muevan en el gel hasta alcanzar una localización predeterminada. Un

AADMFMP de la invención se coloca en los pocillos del cátodo del gel y el gel se somete de nuevo a electroforesis a una tensión adecuada durante un periodo de tiempo específico para permitir que el AADMFMP entre en contacto con los autoanticuerpos presentes en las muestras de ensayo y forme una precipitina como se describe en el presente documento.

Por ejemplo, una tensión adecuada puede ser de 50 V y una cantidad de tiempo específica puede variar de aproximadamente 5 a aproximadamente 120 minutos, de aproximadamente 10 a 120 minutos e incluyendo, pero sin limitación, aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o aproximadamente 110 minutos. En algunos casos, una cantidad de tiempo específica puede superar los 120 minutos. Se cree que la elección de tensión adecuada y cantidad de tiempo específica que permitirán que el AADMFMP de acuerdo con, o usado en, los métodos de la invención, entre en contacto con cualquier autoanticuerpo presente en las muestras de ensayo y forme una precipitina, está dentro de la experiencia de la técnica.

Después de la electroforesis se forman bandas de precipitinas en el dispositivo de ensayo CIE que se visualizan por transiluminación de luz azul del gel visualizado a través de un filtro ámbar. La transiluminación puede realizarse como se conoce en la técnica, por ejemplo, usando un microscopio, o un sistema de documentación de gel u otro tipo de lector de gel, equipado con los equipos de filtro de fluorescencia apropiados.

En una realización no limitante, puede realizarse un ensayo de CIE de acuerdo con la invención usando un formato de microcontraelectroforesis (microCIE) (Figs 9b y 10). Un gel, por ejemplo un gel de agarosa de fuerza de gel y concentración de tampón apropiadas (área sombreada) se moldea en un hueco rectangular en un material de soporte adecuado para producir una profundidad de gel adecuada. Preferentemente el hueco rectangular es un hueco rectangular de 37,5 x 50 mm y la profundidad del gel es de 2 mm, pero el hueco y la profundidad del gel no están limitados a esto. El material de soporte adecuado se ha configurado, por ejemplo, como una placa de ensayo de CIE u otro dispositivo de CIE de ensayo. El material de soporte en el que se ha formado el hueco, por ejemplo, durante la construcción de la placa o el dispositivo, o por maquinación posterior, pero sin limitación, puede hacerse de cualquier material de soporte adecuado incluyendo, pero sin limitación, diversos polímeros acrílicos, poliestireno o poliestirenos o metacrilato o metacrilatos y similares. En una realización, el material de soporte se configura como o de una lámina acrílica transparente.

Este gel se configura para contener pocillos de muestras que pueden, por ejemplo, formarse cuando se moldea el gel. Los pocillos también pueden, por ejemplo, escindirse del gel moldeado y extraerse usando un tubo metálico unido a un dispositivo de succión. Se añaden muestras de suero obtenidas de un sujeto para ensayar (es decir, que contienen un autoanticuerpo diana) a la columna de pocillos en la izquierda, y se añade un autoantígeno diana (incluyendo, por ejemplo, un AADMFMP de la invención) a la columna de pocillos a la derecha. Se aplica una corriente eléctrica adecuada a través de un cátodo en contacto con el lado izquierdo del gel (más allá de los pocillos de muestras del sujeto) y un ánodo en contacto con el lado derecho del gel (más allá de los pocillos de antígeno).

Por ejemplo, las muestras del sujeto colocadas en los pocillos del ánodo se someten a electroforesis a la tensión adecuada durante un periodo de tiempo específico para permitir que los autoanticuerpos presentes en las muestras de ensayo se muevan en el gel hasta alcanzar una localización predeterminada. Un AADMFMP de la invención colocado en los pocillos del cátodo del gel se somete después a electroforesis a una tensión adecuada durante un periodo de tiempo específico para permitir que el AADMFMP entre en contacto con los autoanticuerpos presentes en las muestras de ensayo y formen una precipitina como se describe en el presente documento.

Se presentan varias realizaciones no limitantes de un ensayo de CIE de acuerdo con la invención como los Ejemplos 7 y 8. De acuerdo con el método mostrado en el Ejemplo 8, la detección de precipitación de autoanticuerpos puede llevarse a cabo en tan poco como aproximadamente 10 minutos.

La "inmunodifusión doble (IDD; también conocida como "inmunodifusión doble de Ouchterlony" o "inmunodifusión en gel de agar") es un método relativamente sencillo que puede usarse para la detección de antígenos nucleares extraíbles (ANE). Se realiza IDD usando un medio de difusión en gel que contiene una serie de pocillos. En un ejemplo de un ensayo de IDD de acuerdo con la invención, los pocillos se configuran con un único pocillo central rodeado de una serie de pocillos periféricos. Los pocillos periféricos pueden colocarse simétricamente alrededor del pocillo central. Como alternativa, los pocillos periféricos de diferentes tamaños se colocan alrededor del pocillo central.

En una realización no limitante, el ensayo de IDD puede prepararse usando un formato de microIDD (fig. 9a). Un medio de gel apropiado, por ejemplo un gel de agarosa de una fuerza de gel y concentración de tampones apropiados (área sombreada) (pero sin limitación) puede moldearse en un hueco en un material de soporte adecuado para producir una profundidad de gel adecuada. En un ejemplo el hueco es circular, pero sin limitación. El material de soporte adecuado se ha configurado como una placa de ensayo de IDD u otro dispositivo de ensayo de IDD. El material de soporte en el que se ha formado el hueco, por ejemplo, durante la construcción de la placa o el dispositivo, o por maquinación posterior, pero sin limitación, puede hacerse de cualquier material de soporte adecuado incluyendo pero sin limitación diversos polímeros acrílicos, poliestireno o poliestirenos o metacrilato o

metacrilatos, y similares. En una realización, el material de soporte se configura a partir de o como una lámina acrílica transparente.

En un ejemplo usando un hueco circular, el hueco circular contenido o formado dentro del material de soporte es de cualquier diámetro adecuado, por ejemplo, un hueco circular de 25 a 50 mm de diámetro, preferentemente 25 mm. La profundidad del gel formada por el gel moldeado en el hueco circular es de forma similar de cualquier profundidad adecuada. Lo que es importante en esta realización es que el diámetro del hueco circular y la profundidad del gel sean apropiados para permitir que antígenos diana y anticuerpos diana (incluyendo autoantígenos diana y autoanticuerpos diana) en difusión entren en contacto y formen una precipitina detectable en las condiciones de reacción elegidas. Las profundidades del gel adecuadas pueden ser, por ejemplo, de 0,5 a 5 mm, preferentemente de 1 a 4 mm, más preferentemente de 1,5 a 3 mm, más preferentemente de 2 mm.

Se cortaron pocillos en el gel formado en el hueco circular, por ejemplo como se muestra en la figura 9a. El gel escindido se retira de los pocillos usando un tubo metálico unido a un dispositivo de succión. Se añaden muestras de suero obtenidas de un sujeto para ensayar a los pocillos exteriores, y se añade un antígeno diana, incluyendo pero sin limitación un AADMFP de la invención, al pocillo central. Las muestras de suero pueden diluirse o no diluirse como se conoce en la técnica o como se describe en el presente documento.

Después se permite que los anticuerpos para detectar de la muestra de ensayo y los antígenos diana difundan a través del medio de difusión de gel durante un periodo de tiempo adecuado para formar una precipitina. La formación de precipitina se produce en una interfaz en la que las concentraciones de los anticuerpos para detectar y los antígenos diana están presentes a concentraciones equivalentes.

En una realización de acuerdo con la invención, se colocan muestras de suero de ensayo obtenidas de sujetos que tienen o se sospecha que tienen un trastorno autoinmunitario, en los pocillos periféricos. Se coloca un AADMFP de la invención en el pocillo central. Se permite que las muestras de ensayo y AADMFP difundan a través del medio de difusión de gel tamponado durante un periodo de tiempo adecuado de modo que se formen precipitinas como se describen en el presente documento. Por ejemplo, un periodo de tiempo adecuado puede ser de 24 a 48 horas, pero sin limitación.

En algunos casos, puede usarse más de un pocillo periférico, lo que conduce a múltiples resultados posibles basándose en la reactividad y especificidad de los autoantígenos y autoanticuerpos seleccionados. La zona de formación de precipitina puede indicar una identidad completa (es decir una línea continua), identidad parcial (es decir una línea continua con una rama en un extremo) o una ausencia de identidad (es decir las dos líneas se cruzan completamente) de la combinación de antígeno/anticuerpo seleccionada.

Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, el solicitante cree que la formación de precipitina tiene lugar debido al carácter multivalente de la mayoría de autoantígenos. Típicamente un antígeno tiene varios determinantes antigénicos que permiten la unión de múltiples anticuerpos. Típicamente, los autoanticuerpos tienen al menos dos sitios de unión a antígeno. En algunos casos, por ejemplo, el caso de IgM, puede haber hasta 10 sitios de unión a antígeno. Debido a estos múltiples sitios, pueden formarse agregados grandes o complejos reticulados de antígenos y anticuerpos.

Un aumento de la cantidad de antígeno en relación con una cantidad constante de anticuerpo permite que esencialmente todos los anticuerpos diana en una muestra de ensayo dada se unan con el antígeno en la precipitina. Preferentemente, todos los anticuerpos diana en una muestra de ensayo dada se unen con el antígeno en la precipitina. Esta se denomina la zona de exceso de anticuerpo (es decir fenómeno de prozona). Por ejemplo, a medida que la concentración de un antígeno dado aumenta debido a la difusión a través del medio de difusión de gel, la cantidad de proteína precipitada en los complejos reticulados aumentará. Una "zona de equivalencia" o "punto de equivalencia" se formará una vez que la relación de antígeno/anticuerpo sea óptima. Cuando la cantidad de antígeno que se difunde a través del medio de difusión de gel supere la cantidad de anticuerpo, la formación de precipitina se reducirá, lo que conduce a una "zona de exceso de antígeno".

"Sustancialmente las mismas características de unión" se refiere a un anticuerpo o antígeno que es un fragmento funcional, una variante funcional o una variante funcional de un anticuerpo, autoanticuerpo, antígeno o autoantígeno diana como se describe en el presente documento que tiene esencialmente la misma selectividad y sensibilidad de unión que otro anticuerpo, autoanticuerpo, antígeno o autoantígeno con el que se compara el primer anticuerpo, antígeno, autoanticuerpo o autoantígeno. Típicamente dicha molécula que tiene sustancialmente las mismas características de unión compartirá una estructura polipeptídica tridimensional suficientemente similar para conservar esencialmente la misma selectividad y sensibilidad de unión que la molécula con la que se compara. Preferentemente, esencialmente la misma selectividad o sensibilidad de unión es la misma selectividad o sensibilidad de unión.

La expresión "muestra biológica" se usa indistintamente en el presente documento con la expresión "muestra de ensayo" y se refiere a cualquier muestra obtenida de un sujeto para explorar. Preferentemente el sujeto para

explorar tiene o se sospecha que tiene un trastorno autoinmunitario. La muestra de ensayo puede ser cualquier muestra conocida en la técnica en la que pueda detectarse un anticuerpo diana o autoanticuerpo diana de interés.

Se incluye cualquier fluido corporal tal como plasma, sangre, saliva, líquido intersticial, suero, orina, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, linfa, líquido seminal, líquido amniótico, líquido pericárdico y líquido ascítico. Se incluyen muestras de cualquier sujeto tal como los sujetos que presentan un fenotipo clínico que sugiere o es indicativo de una enfermedad o un trastorno autoinmunitario, pero sin limitación. También se incluyen muestras de control que pueden ser de sujetos sanos normales sin historial clínico de enfermedad o trastorno autoinmunitario o que pueden ser muestras artificiales que contienen una cantidad conocida de un anticuerpo diana o autoanticuerpo diana que se sabe que no son reactivos (por ejemplo, sin unión) con un antígeno diana o autoantígeno diana que se marca para producir los AADMFMP de la invención.

Las muestras de ensayo que pueden usarse en los métodos de acuerdo con la invención pueden obtenerse de cualquier fuente. Por ejemplo, en una realización, las muestras de ensayo se obtienen de un animal, preferentemente un ave o un mamífero, más preferentemente un mamífero. Preferentemente el mamífero incluye mamíferos humanos y no humanos tales como gatos, perros, caballos, cerdos, vacas, ovejas, ciervos, ratones, ratas, primates (incluyendo gorilas, monos rhesus y chimpancés), zarigüeyas y otros animales de granja o zoológico domésticos, pero sin limitación. Preferentemente el mamífero es una vaca o una oveja. Preferentemente el mamífero es un ser humano.

La expresión "que comprende" como se usa en la presente memoria descriptiva y reivindicaciones significa "que consiste al menos en parte en"; es decir cuando se interpreten declaraciones en la presente memoria descriptiva y reivindicaciones que incluyan "que comprende", los elementos precedidos por esa expresión en cada declaración deben estar presentes pero también pueden estar presentes otros elementos. Términos relacionados tales como "comprende" y "comprendido" deben interpretarse de manera similar.

El término "polipéptido", como se usa en el presente documento, abarca cadenas de aminoácidos de cualquier longitud de una secuencia polipeptídica específica o en combinación de las mismas, en las que los restos de aminoácidos se unen por enlaces peptídicos covalentes. El término puede referirse a un polipéptido que es un producto natural purificado, o que se ha producido parcial o completamente usando técnicas recombinantes o sintéticas. El término puede referirse a un agregado de un polipéptido tal como un dímero u otro multímero, un polipéptido de fusión, un fragmento polipeptídico, una variante polipeptídica o derivado de los mismos.

Un "fragmento" de un polipéptido es una subsecuencia del polipéptido que realiza una función que se requiere para la actividad biológica o unión y/o proporciona estructura tridimensional del polipéptido. El término puede referirse a un polipéptido, un agregado de un polipéptido tal como un dímero u otro multímero, un polipéptido de fusión, un fragmento polipeptídico, una variante polipeptídica o derivado de los mismos capaz de realizar la función peptídica requerida.

Como se usa en el presente documento, el término "variante" se refiere a una secuencia de aminoácidos de anticuerpo diana, autoanticuerpo diana, antígeno diana o autoantígeno diana que es diferente de una secuencia específicamente identificada, en la que se suprimen, se sustituyen o añaden uno o más restos de aminoácidos. Las variantes pueden ser variantes alélicas de origen natural, o variantes de origen no natural. Las variantes pueden ser de la misma especie o de otra especie y pueden abarcar homólogos, parálogos y ortólogos. En ciertas realizaciones, las variantes de anticuerpos diana, autoanticuerpos diana, antígenos diana o autoantígenos diana útiles en la invención tienen actividades biológicas que son iguales o sustancialmente similares a las de los anticuerpos diana, autoanticuerpos diana, antígenos diana o autoantígenos diana parentales. El término "variante" en referencia a anticuerpos diana, autoanticuerpos diana, antígenos diana o autoantígenos diana abarca todas las formas de anticuerpos diana, autoanticuerpos diana, antígenos diana o autoantígenos diana como se define en el presente documento.

El término "variante" en referencia a anticuerpos diana, autoanticuerpos diana, antígenos diana o autoantígenos diana también abarca anticuerpos diana, antígenos diana, autoantígenos diana o polipéptidos de origen natural, producidos de forma recombinante y producidos de forma sintética. Las secuencias de anticuerpo diana, autoanticuerpo diana, antígeno diana o autoantígeno diana variantes preferentemente muestran al menos 50 %, 60 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y preferentemente al menos 99 % de identidad con una secuencia de anticuerpo diana, autoanticuerpo diana, antígeno diana o autoantígeno diana útil en la presente invención. La identidad se encuentra sobre una ventana de comparación de al menos 5 posiciones de aminoácidos, preferentemente al menos 7 posiciones de aminoácidos, preferentemente al menos 10 posiciones de aminoácidos, preferentemente al menos 15 posiciones de aminoácidos, preferentemente al menos 20 posiciones de aminoácidos y más preferentemente sobre la longitud completa de un anticuerpo diana, autoanticuerpo diana, antígeno diana o autoantígeno diana usado en la invención.

Las variantes de anticuerpo diana, autoanticuerpo diana, antígeno diana o autoantígeno diana también abarcan las que muestran similitud con uno o más de los anticuerpos diana, antígenos diana, autoantígenos diana o secuencias

polipeptídicas específicamente identificados que probablemente conserven la equivalencia funcional de esas secuencias y que no podría esperarse razonablemente que se hubieran producido al azar.

La identidad y similitud de secuencias polipeptídicas puede determinarse de la siguiente manera. La secuencia polipeptídica objeto se compara con una secuencia polipeptídica candidata usando BLASTP (del conjunto de programas BLAST, versión 2.2.14 [mayo de 2006]) en bl2seq, que está públicamente disponible de NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>). Los parámetros por defecto de bl2seq se utilizan excepto que debería inactivarse el filtrado de regiones de baja complejidad.

La similitud de secuencias polipeptídicas puede examinarse usando los siguientes parámetros de línea de comando UNIX:

bl2seq -i peptide1 -j peptide2 -F F -p blastp

El parámetro -F F inactiva la filtración de secciones de baja complejidad. El parámetro -p selecciona el algoritmo apropiado para el par de secuencias. Este programa encuentra regiones de similitud entre las secuencias y para cada una de dichas regiones presenta un "valor E" que es el número esperado de veces que podría esperarse ver dicha coincidencia al azar en una base de datos de un tamaño de referencia fijo que contiene secuencias aleatorias. Para valores E pequeños, mucho menores de 1, esta es aproximadamente la probabilidad de dicha coincidencia aleatoria.

Las secuencias polipeptídicas variantes muestran preferentemente un valor E de menos de 1×10^{-6} , más preferentemente menos de 1×10^{-9} , más preferentemente menos de 1×10^{-12} , más preferentemente menos de 1×10^{-15} , más preferentemente menos de 1×10^{-18} y más preferentemente menos de 1×10^{-21} en comparación con una cualquiera de las secuencias identificadas específicamente.

La identidad de secuencias polipeptídicas también puede calcularse sobre la longitud completa del solapamiento entre una secuencia polipeptídica candidata y una objeto usando programas de alineamiento de secuencias global. EMBOSS-needle (disponible en <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>) y GAP (Huang, X. (1994) On Global Sequence Alignment. Computer Applications in the Biosciences 10, 227-235.) como se ha analizado anteriormente son programas de alineamiento de secuencias globales adecuados para calcular identidad de secuencias polipeptídicas.

El uso de BLASTP como se ha descrito anteriormente se prefiere para su uso en la determinación de variantes polipeptídicas de acuerdo con la presente invención.

Un anticuerpo diana, autoanticuerpo diana, antígeno diana o autoantígeno diana variante incluye anticuerpos diana, autoanticuerpos diana, antígenos diana o autoantígenos diana en los que la secuencia de aminoácidos difieren de la secuencia de un anticuerpo diana, autoanticuerpo diana, antígeno diana o autoantígeno diana no variante por una o más sustituciones, supresiones, adiciones o inserciones de aminoácidos conservativas que no afectan a la actividad biológica del anticuerpo diana, autoanticuerpo diana, antígeno diana o autoantígeno diana. Las sustituciones conservativas típicamente incluyen la sustitución de un aminoácido por otro con características similares, por ejemplo, sustituciones dentro de los siguientes grupos: valina, glicina; glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparaginas, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. Los ejemplos de sustituciones conservativas y semiconservativas pueden tomarse de la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Resto original	Sustituciones ejemplares	Sustitución preferida
Ala (A)	val; leu; ile; pro	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn(N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn; his	his
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	phe; val

Resto original	Sustituciones ejemplares	Sustitución preferida
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	val
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	Thr; gly	gly
Thr (T)	ser; ala; pro	ser; ala
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en las propiedades de cadena lateral comunes:

(1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;

(3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;

(5) restos que influyen en la orientación de cadena: gly, pro; y

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas implicaran intercambiar un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase.

Las sustituciones, supresiones, adiciones o inserciones pueden realizarse por métodos de mutagénesis conocidos en la técnica. Un experto en la materia será consciente de métodos para realizar sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas. Véase por ejemplo Bowie *et al.*, 1990, Science 247, 1306.

"Sujeto" como se usa en el presente documento es preferentemente un animal. Preferentemente el animal es un mamífero. Preferentemente el mamífero incluye mamíferos humanos y no humanos tales como gatos, perros, caballos, cerdos, vacas, ovejas, ciervos, ratones, ratas, primates (incluyendo gorilas, monos rhesus y chimpancés), zarigüeyas y otros animales domésticos de granja o zoológicos, pero sin limitación. Preferentemente el mamífero es un ser humano.

La expresión "fenotipo clínico " como se usa en el presente documento se refiere a las características observables completas de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad o un trastorno particular, por ejemplo, un trastorno autoinmunitario. Estas características incluyen todos los rasgos anatómicos, fisiológicos, bioquímicos y conductuales, como se determina por la interacción de la composición genética y factores ambientales. En general los síntomas de una enfermedad autoinmunitaria varían ampliamente y dependen de la enfermedad específica. Un grupo de síntomas que puede aparecer con enfermedades autoinmunitarias puede incluir mareos, fatiga y malestar general y/o fiebre de grado bajo.

Un "ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)", también conocido como un inmunoensayo ligado a enzimas, EIA como se usa en el presente documento toma su significado regular como se conoce y usa en la técnica. En general, un ELISA es un ensayo que se basa en una reacción de conversión enzimática y se usa para detectar la presencia de sustancias específicas incluyendo, pero sin limitación, enzimas, virus, anticuerpos y bacterias.

Se pretende que la referencia a una serie de números desvelada en el presente documento (por ejemplo de 1 a 10) también incorpore la referencia a todos los números relacionados dentro de ese intervalo (por ejemplo, 1, 1,1, 2, 3, 3,9, 4, 5, 6, 6,5, 7, 8, 9 y 10) y también cualquier intervalo de números racionales dentro de ese intervalo (por ejemplo de 2 a 8, 1,5 a 5,5 y 3,1 a 4,7) y, por lo tanto, todos los subintervalos de todos los intervalos desvelados expresamente en el presente documento se desvelan expresamente. Esto son solamente ejemplos de lo que se pretende específicamente y debe considerarse que todas las posibles combinaciones de valores numéricos entre el

valor más bajo y el valor más alto enumerados se indica expresamente en la presente solicitud de una manera similar.

Antígenos y autoantígenos diana marcados con fluorescencia de moléculas pequeñas

El trabajo detallado en el presente documento da lugar a numerosos aspectos de invención relacionados con la detección de dichos autoanticuerpos diana que proporcionan, por ejemplo, composiciones que comprenden autoantígenos diana marcados con fluorescencia de moléculas pequeñas (AADMFMP) que pueden usarse en los métodos de la invención como se describe en el presente documento. También se incluyen kits que emplean dichos AADMFP para su uso en estos métodos.

Dichos autoantígenos diana que se marcan con fluorescencia como AADMFP de acuerdo con la invención y que se usan posteriormente en los métodos de la invención como se detalla en el presente documento preferentemente están aislados. Pueden aislarse o purificarse de fuentes naturales usando una diversidad de técnicas que se conocen bien en este campo (por ejemplo Deutscher, 1990, Ed, Methods in Enzymology, Vol. 182, Guide to Protein Purification). Las tecnologías incluyen HPLC, cromatografía de intercambio iónico e inmunocromatografía pero sin limitación.

En una realización, los autoantígenos diana, incluyendo fragmentos funcionales, variantes funcionales y derivados funcionales de los mismos pueden repararse por cualquier medio convencional conocido habitualmente y usado en la técnica.

Por ejemplo, los autoantígenos diana o fragmentos funcionales, variantes funcionales y derivados funcionales de los mismos pueden aislarse de fuentes naturales, incluyendo pero sin limitación animales. Preferentemente los animales son aves o mamíferos. Preferentemente el mamífero incluye ser humano y mamíferos no humanos tales como gatos, perros, caballos, cerdos, vacas, ovejas, ciervos, ratones, ratas, primates (incluyendo gorilas, monos rhesus y chimpancés), zarigüeyas y otros animales domésticos de granja o zoológicos pero sin limitación. Preferentemente el mamífero es una vaca o una oveja. Preferentemente el mamífero es un ser humano.

Como alternativa los autoantígenos diana pueden expresarse de forma recombinante en células hospedadoras adecuadas y separarse de las células usando técnicas convencionales de biología molecular como se conocen y se usan en la técnica Sambrook *et al.*, (mencionado anteriormente).

Por ejemplo, las células hospedadoras que comprenden casetes de expresión y vectores que comprenden polinucleótidos que codifican un autoantígeno diana, o fragmento funcional, variante funcional o derivado funcional del mismo para marcar como un AADMFP de acuerdo con la invención son útiles en métodos para producción recombinante de polipéptidos. Se conocen bien en la técnica métodos para producir proteínas recombinantes y se describen en general en Sambrook *et al.*, (mencionado anteriormente) y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing, 1987. También se conocen métodos para transformar células hospedadoras seleccionadas con los vectores, por ejemplo, el tratamiento de cloruro cálcico descrito en Cohen, SN; PNAS 69, 21 10, 1972.

Los métodos para producir polipéptidos recombinantes implican habitualmente el cultivo de células hospedadoras en un medio apropiado en condiciones adecuadas para o que conducen a expresión y selección de un polipéptido de interés. Las células con un marcador seleccionable pueden cultivarse adicionalmente en medio apropiado para la selección de células hospedadoras que expresan un polipéptido de interés. Las células hospedadoras transformadas que expresan un polipéptido de interés se seleccionan y cultivan en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido. El polipéptido recombinante expresado puede separarse y purificarse del medio de cultivo usando métodos bien conocidos en la técnica incluyendo precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, cromatografía de afinidad, electroforesis y similares (por ejemplo Deutscher, Ed, 1990, Methods in Enzymology, Vol 182, Guide to Protein Purification). Las células hospedadoras también pueden ser útiles en métodos para la producción de un producto generado por un polipéptido expresado de interés.

Por ejemplo, pueden usarse diversas células hospedadoras para producción recombinante de un autoantígeno diana, o un fragmento funcional, variante funcional o derivado funcional del mismo, para marcar como un AADMFP de acuerdo con la invención, a partir de un casete de expresión o vector. Dichas células hospedadoras pueden derivar de fuentes procariotas o eucariotas, por ejemplo levadura, bacterias, hongos, insectos (por ejemplo baculovirus), organismos animales, mamíferos o vegetales. En una realización las células hospedadoras son células hospedadoras aisladas. Los procariotas más habitualmente empleados como células hospedadoras son cepas de *E coli*. Otros hospedadores procariotas incluyen *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Streptomyces*, *Listeria*, *Saccharomyces*, *Salmonella* y *Mycobacteria* pero sin limitación.

Las células eucariotas para expresión de proteína recombinante incluyen pero sin limitación células Vero, HeLa, CHO (células de ovario de hámster chino), 293, células BHK, células MDCK, y células COS así como líneas celulares de cáncer de próstata tales como PrEC, LNCaP, Du 145 y RWPE-2. Estas células están disponibles de ATCC, Virginia, Estados Unidos.

En una realización, un método para preparar un autoantígeno diana, o fragmento funcional, o variante funcional o derivado funcional del mismo, para marcar como un AADMFMP de acuerdo con la invención comprende las etapas de transformar una célula hospedadora con un casete o vector de expresión que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica el autoantígeno diana, o fragmento funcional, o variante funcional o derivado funcional del mismo, cultivar la célula hospedadora en condiciones por las que el autoantígeno diana, o fragmento funcional, variante funcional o derivado funcional del mismo se expresa y posteriormente aislar el autoantígeno diana expresado, o fragmento funcional, o variante funcional o derivado funcional del mismo.

En general, varios autoantígenos diana, o fragmentos funcionales, o variantes funcionales o derivados funcionales de los mismos que pueden marcarse convenientemente para formar el AADMFMP de acuerdo con la invención o que pueden usarse en las composiciones o métodos de la invención pueden obtenerse de proveedores comerciales incluyendo: AROTEC Diagnostics Limited (Lower Hutt, Nueva Zelanda; www.arodia.com). Immunovision, Inc. (Springdale, AR, USA www.immuno-vision.com); The Antigen Site (San Diego, CA, Estados Unidos www.antigensite.com).

Preparación de antígenos diana y autoantígenos diana marcados

El autoantígeno diana de o útil de acuerdo con la invención comprende al menos un fragmento funcional, derivado funcional o variante funcional de un autoantígeno diana de interés que se ha marcado químicamente con un fluoróforo de molécula pequeña. Un autoantígeno diana fluorescente de moléculas pequeñas marcado químicamente conserva sustancialmente toda, preferentemente toda, la selectividad y sensibilidad de unión de autoantígeno diana no marcado por su autoanticuerpo diana o afín.

En una realización, el AADMFMP de acuerdo con la invención se marca con cualquier fluoróforo de molécula pequeña adecuado seleccionado basándose en sus propiedades espectrales, que son preferentemente similares a isotiocianato de fluoresceína (FITC). Esto significa que el fluoróforo de molécula pequeña puede detectarse usando el mismo equipamiento que el usado para detectar FITC.

FITC se usa habitualmente en la detección de autoanticuerpos por microscopia de inmunofluorescencia. Este compuesto tiene un máximo de excitación a longitud de onda de 495 nm y un máximo de emisión a longitud de onda de 517 nm, y se detecta habitualmente usando una combinación de filtro de excitación/filtro de barrera apropiada. Muchos de esos fluoróforos de moléculas pequeñas están disponibles y serán conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, Miller L. W. (ed.) Probes and Tags to Study Biomolecular Function: for Proteins, RNA, and Membranes, 2008. pp 193; Haugland R. P. (ed.): The Handbook. A Guide to Fluorescent Probes and Labelling Technologies 10ª ed., 2005 (Invitrogen Corp.)).

Por ejemplo, el fluoróforo de molécula pequeña puede ser un derivado de FITC, incluyendo, pero sin limitación, AlexaFluor 488 o DyLight 488, que se ha adaptado para diversas aplicaciones químicas y biológicas en las que son necesarias mayor fotoestabilidad, mayor intensidad de fluorescencia y/o diferentes grupos de unión. Pueden encontrarse ejemplos adicionales de fluoróforos que pueden ser adecuados para su uso en la producción de un AADMFMP de o útil en la invención enumerados en la Tabla 1.

En una realización no limitante, los fluoróforos pueden unirse de forma covalente con autoantígenos diana mediante un proceso denominado conjugación. En la conjugación, el fluoróforo se une covalentemente mediante reacción con un grupo de cadena lateral de aminoácidos accesible del antígeno diana. Típicamente un derivado reactivo del fluoróforo se presenta al antígeno diana. Se conocen en la técnica varios derivados fluoróforos diferentes que reaccionan con diversos grupos reactivos en autoantígenos diana y pueden usarse de acuerdo con la invención. Por ejemplo los derivados fluoróforos que reaccionan con grupos amina de antígeno diana pueden incluir isotiocianatos, succinimidil ésteres, sulfosuccinimidil ésteres, tetrafluorofenil ésteres, carbonil azidas y sulfonil cloruros; los derivados fluoróforos que reaccionan con grupos tiol de antígenos diana pueden incluir yodoacetamidas, maleimidas, alquil hidruros y agentes arilantes; y derivados fluoróforos que reaccionan con grupos de alcohol de antígenos diana que se han oxidado con peryodato para producir aldehídos pueden incluir derivados de hidracina, hidroxitamina o amina.

Además, para ser un fluoróforo de molécula pequeña sustituto adecuado, la modificación covalente del autoantígeno diana no debe alterar significativamente la selectividad y especificidad del autoantígeno diana por su anticuerpo diana.

Detección de anticuerpos diana

Los solicitantes han determinado que pueden usarse AADMFMP eficazmente para detección sensible y selectiva de anticuerpos diana en un tipo de ensayo de inmunodifusión.

El solicitante ha descubierto que el marcaje fluorescente de autoantígenos diana, usando moléculas pequeñas como se describe en el presente documento, no tiene ningún efecto significativo en las características de unión de los antígenos marcados por sus anticuerpos afines. Esta observación está en desacuerdo con opiniones establecidas

de las características de unión de antígeno/anticuerpo. Generalmente, la técnica de inmunología, particularmente la inmunodetección, considera que cambios incluso menores en la estructura del antígeno o anticuerpo pueden tener efectos significativos en las características de unión.

La visión generalmente aceptada de esta técnica es que la modificación covalente de aminoácidos que son importantes para determinar la estructura tridimensional de anticuerpos y antígenos puede conducir a pérdida o reducción de la reactividad de anticuerpo/antígeno (es decir, selectividad y especificidad). Esta pérdida o reducción es particularmente evidente cuando dicha modificación covalente está dentro de regiones de determinación antigénica (es decir, epítopos y regiones de unión a epítopos).

En contradicción directa con esto, el solicitante ha mostrado que la unión de un fluoróforo de molécula pequeña con un antígeno, particularmente un autoantígeno, constituye una modificación covalente que no da como resultado pérdida o reducción de la reactividad de anticuerpo/antígeno. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, el solicitante cree que esto se debe a que los aminoácidos que son importantes para epítopos de autoantígenos no se modifican, o si se modifican esta modificación se tolera lo suficiente para que no se observe ninguna reducción significativa de la reactividad con autoanticuerpos afines.

El solicitante ha mostrado por primera vez que pueden usarse autoantígenos marcados con fluorescencia de molécula pequeña para detectar específicamente autoanticuerpos en una muestra que se sospecha que contiene autoanticuerpos con una selectividad y sensibilidad de detección que minimiza los resultados falsos positivos y/o falsos negativos en comparación con detección de autoanticuerpos usando formatos de ensayo de inmunoprecipitación convencionales, incluyendo IDD convencional, contrainmunolectroforesis y ELISA.

El solicitante ha mostrado además que los AADMFP de acuerdo con la invención pueden usarse en inmunoensayos de tipo difusión para detectar por fluorescencia y semicuantificar autoanticuerpos en una muestra que contiene o se sospecha que contiene autoanticuerpos. Preferentemente el inmunoensayo de tipo difusión es un ensayo de inmunodifusión doble o ensayo de contrainmunolectroforesis como se describe en el presente documento. Preferentemente el ensayo de inmunodifusión doble o contrainmunolectroforesis se lleva a cabo en un dispositivo de inmunoprecipitación. Más preferentemente el dispositivo de inmunodifusión es un dispositivo de microinmunodifusión de acuerdo con la invención.

La detección de autoanticuerpos de acuerdo con los métodos del solicitante puede realizarse con mayor sensibilidad que la que puede conseguirse con ensayos de inmunoprecipitación de IDD convencionales como se emplean en la actualidad en la técnica. Por ejemplo, el solicitante ha mostrado que la sensibilidad de detección puede aumentarse hasta diez veces usando sus métodos (Figura 4).

La detección de autoanticuerpos de acuerdo con la invención también puede llevarse a cabo con menos resultados falsos positivos en comparación con ELISA. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, el solicitante cree que esto se debe a que ELISA es una técnica particularmente sensible. Se sabe por lo tanto que ELISA proporciona resultados débilmente positivos, denominados resultados positivos bajos "límitrofes" o "de área gris". Frecuentemente, dichos resultados no son coherentes con la presentación clínica y se determina posteriormente que son resultados positivos "falsos".

En consecuencia, los AADMFP usados en los métodos de acuerdo con la invención pueden proporcionar un diagnóstico más preciso de numerosas enfermedades autoinmunitarias en un sujeto, evitando al mismo tiempo los problemas asociados con la necesidad de ensayos confirmatorios adicionales del sujeto, incluyendo el gasto de ensayos adicionales y la inconveniencia general.

En una realización, la concentración de un autoanticuerpo puede determinarse de forma semicuantitativa a partir de una muestra usando un AADMFP y los métodos del solicitante de acuerdo con la invención. Dicha determinación se realiza midiendo la intensidad de fluorescencia en el AADMFP unido en una precipitina de acuerdo con los métodos de la invención.

La expresión "de forma semicuantitativa" como se usa en el presente documento se refiere a una cuantificación que produce una aproximación de la cantidad de una sustancia, entre un resultado cualitativo y uno cuantitativo.

Pueden detectarse complejos de autoantígenos fluorescentes, por ejemplo precipitinas formadas de acuerdo con la invención usando una serie de configuraciones de equipamiento. El equipamiento adecuado que puede usarse para detectar y medir la intensidad de fluorescencia de un AADMFP unido en una precipitina de acuerdo con la invención incluye, pero sin limitación, un sistema Gel Doc XR (BioRad, CA) adaptado con un transiluminador de luz azul Safelmager™ (Invitrogen, CA) con una pantalla de emisión ámbar; un microscopio de inmunofluorescencia Nikon Eclipse 80i con un conjunto de filtro B-2e/C, un explorador láser Fujifilm FLA-5100 con un conjunto de filtros de emisión 532. Como se apreciará, puede usarse cualquier sistema de captura de imágenes adecuado o este puede adaptarse para su uso, con los métodos de acuerdo con la invención, incluyendo numerosos otros sistemas que conocen bien los expertos en la materia y están disponibles habitualmente en laboratorios de investigación.

El practicante de la invención como se describe en el presente documento evita de este modo los costes adicionales y/o la inconveniencia asociada con un requisito de obtención de equipamiento especializado para practicar la invención, más allá de lo que estaría presente habitualmente en un laboratorio clínico o de investigación convencional como se conoce en la técnica.

El análisis de imágenes, incluyendo semicuantificación de la intensidad de fluorescencia puede llevarse a cabo usando cualquier software de captura de imágenes apropiado, incluyendo pero sin limitación software QuantityOne (BioRad, CA), software ImageQuant™ (GE Healthcare, NJ) y/o software NIS Elements (Nikon, NY).

El uso de los AADMFMP del solicitante en métodos de acuerdo con la invención también es ventajoso por ser mucho más simple de realizar (IDD) o mucho más rápido de realizar (CIE), o ambos, que los métodos de ELISA. Además, los métodos de IDD y CIE de acuerdo con la invención son mucho más rápidos que los métodos actuales, no requieren tinción y son más sensibles que IDD o CIE convencionales.

Basándose en sus hallazgos sorprendentes, los solicitantes proporcionan numerosos aspectos de una invención relacionados con un método mejorado de detección de anticuerpos, particularmente autoanticuerpos, en una muestra obtenida de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad o un trastorno autoinmunitario.

También puede decirse que la presente invención consiste en general en las partes, los elementos y las características a los que se hace referencia o que se indican en la memoria descriptiva de la solicitud, individual o colectivamente, y cualquiera de o todas las combinaciones de cualesquiera dos o más de dichas partes, elementos o características, y donde se mencionan números enteros específicos en el presente documento que tienen equivalentes conocidos en la técnica a la que se refiere la presente invención, dichos equivalentes conocidos se consideran incorporados en el presente documento como si se expusieran individualmente.

La invención se ilustrará ahora de una manera no limitante por referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplos y ejemplos de referencia

Inmunodifusión doble (IDD) y contrainmunolectroforesis (CIE) detalladas en los siguientes ejemplos se realizaron de acuerdo con la invención con referencia a Bunn y Kveder 1993. IDD se realizó durante 24 horas en geles de agarosa al 0,8 % con pocillos de muestra de 2,5 mm que estaban a 3,0 mm de distancia. CIE se realizó en geles de agarosa al 1,0 % con pocillos de muestra que estaban a 5,0 mm de distancia.

EJEMPLO 1: *Marcaje de fluorescencia de moléculas pequeñas de un antígeno diana*

El siguiente ejemplo usa el antígeno Ro60 SSA purificado, disponible en el mercado (también denominado en el presente documento "SSA") disponible de AROTEC Diagnostics Limited (Lower Hutt, Nueva Zelanda; www.arodia.com).

El SSA purificado se dializó en tampón de carbonato 0,1 M, pH 9,0; NaCl 0,4 M y después se hizo reaccionar con el fluoróforo ácido carboxílico de AlexaFluor 488, succinimidil éster de acuerdo con las instrucciones del fabricante (The Handbook. A Guide to Fluorescent Probes and Labelling Technologies. MTZ Spence (ed) 2005 por Invitrogen Corp.). Este fluoróforo se seleccionó basándose en propiedades espectrales que son similares a las del fluoresceína isotiocianato (FITC). Este fluoróforo tiene un máximo de excitación a una longitud de onda de 495 nm y un máximo de emisión a 517 nm. AlexaFluor 488 puede detectarse por lo tanto usando técnicas y dispositivos de laboratorio fácilmente disponibles incluyendo, por ejemplo, microscopia de epifluorescencia y/o lectores de placas de fluorescencia, diseñados y equipados para detectar fluorescencia de FITC. Se separó fluoróforo que no había reaccionado del antígeno marcado por filtración en gel. Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) de acuerdo con Laemmli (Nature 220 (1970) 680). El gel de separación contenía acrilamida al 13,5 %. Después de la electroforesis, las proteínas se detectaron por tinción con azul de Coomassie, o se inmunotransfirieron por transferencia a membrana de nitrocelulosa y después se exploraron usando suero del sujeto y conjugado de anti-IgG con fosfatasa alcalina de acuerdo con Towbin *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 4350).

La separación de antígeno SSA marcado con AlexaFluor 488 y no marcado (1,0 µg de cada uno) por SDS-PAGE se visualizó por la tinción de azul de Coomassie (Fig. 1A). Antes de la tinción con azul de Coomassie, se obtuvieron imágenes de SSA fluorescente usando transiluminación de luz azul con un filtro de pantalla ámbar y se capturó usando un sistema GelDoc (BioRad, CA) (Fig. 1B). En todos los casos las imágenes de complejos fluorescentes se analizaron en forma inversa.

Se transfirió un gel repetido a nitrocelulosa y se exploró con una dilución 1:300 de suero del sujeto que contiene anticuerpos anti-SSA durante una noche a temperatura ambiente. La mancha de transferencia se bloqueó durante 1 hora con tampón que contenía albúmina de suero bovino 1 %, se lavó y después se exploró con anti IgG humano conjugado con fosfatasa alcalina durante una hora. La mancha de transferencia se lavó de nuevo y después se reveló usando sustrato de fosfatasa alcalina NBT/BCIP (Fig. 1C).

Como se ha analizado anteriormente, la unión de un fluoróforo con un autoantígeno constituye una modificación covalente que podría dar como resultado concebiblemente la modificación de aminoácidos que son importantes para epítomos de autoantígenos y de este modo reducir la reactividad con autoanticuerpos objeto. En consecuencia, este ejemplo muestra que el marcaje fluorescente en las condiciones descritas no da como resultado un cambio apreciable en el peso molecular del antígeno SSA (evaluado por SDS-PAGE).

Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, el solicitante cree que este resultado sugiere que solamente un número muy limitado de aminoácidos se modifican por el proceso de marcaje (Fig. 1A). Como se esperaría, estos resultados muestran claramente que el antígeno SSA marcado con fluorescencia se detecta fácilmente usando transiluminación de luz azul, mientras que el antígeno SSA no marcado no (Fig. 1B). La inmunotransferencia usando un suero del sujeto que contiene anticuerpos anti-SSA confirma que el marcaje fluorescente no altera ni reduce sustancialmente la reactividad de SSA a autoanticuerpos objeto (Fig. 1C).

EJEMPLO 2: *Determinación de las características de unión de ADMFMP o AADMFP por ELISA.*

Se realizó ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de acuerdo con Charles y Maini 1993 Man. Biol. Mark. Dis. (Kluwer Academic) usando placas Nunc MaxiSorb y conjugado de anti-IgG con peroxidasa de rábano rusticano. Se recubrieron placas de ELISA con SSA marcado con AlexaFluor 488 y no marcado (Nunc Thermo, Fisher, NY) a 0,25, 0,5 y 1 µg/ml (100 µl por pocillo) durante una noche a 4 °C. Las placas se lavaron y se bloquearon durante 4 horas a temperatura ambiente antes de la adición de 7 muestras de suero diluidas 1:100 (1 donante sano y 6 muestras de suero del sujeto que contenían anticuerpos anti SSA) durante 1 hora. Las placas de ELISA se lavaron y se incubaron con anti IgG humano conjugado con peroxidasa de rábano rusticano a una dilución 1:30.000 (Jackson ImmunoResearch, PA) durante 1 hora. Las placas se lavaron y se revelaron usando sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) durante 10 minutos y la reacción se detuvo usando H₂SO₄ y la absorbancia se leyó a 450 nm.

Se usó ELISA para evaluar adicionalmente la reactividad de antígeno SSA marcado con fluorescencia en relación con SSA no marcado (Fig. 2). No se encontró ningún cambio apreciable en la reactividad con autoanticuerpos objeto cuando se recubrieron placas de ELISA con SSA marcado y no marcado a tres concentraciones diferentes. Este resultado sugiere que la unión del fluoróforo con antígeno SSA no da como resultado la modificación o reducción del acceso del autoantígeno diana a los autoepítomos diana.

EJEMPLO 3: *Comparación de la detección de autoanticuerpo usando IDD y detección de fluorescencia de AADMFP en precipitinas en comparación con epiiluminación*

La utilidad de SSA marcado con fluorescencia para detectar la precipitación de autoanticuerpos se investigó usando IDD. Se dejó un suero de paciente que contenía anticuerpos anti SSA sin diluir o diluido 4, 16, 32, 64 y 128 veces y después se añadieron 5 µl a los pocillos 1-6 respectivamente de cuatro placas de IDD (Fig. 3). Se añadieron 5 µl de SSA marcado con AlexaFluor 488 a una concentración de 6,25, 12,5, 25 y 50 µg/ml al pocillo central (Fig. 3). Las placas de IDD se sellaron, se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 24 horas y se detectaron después complejos de precipitina de AlexaFluor 488-SSA usando transiluminación de luz azul con filtro ámbar.

También se evaluaron complejos de inmunoprecipitación (es decir, bandas de precipitina blancas) por detección no fluorescente (epiiluminación con luz blanca frente a un fondo negro) usando un densitómetro personal Molecular Dynamics SI y software ImageQuant™ (GE Healthcare). Los resultados se muestran para suero del sujeto no diluido o diluido 4, 16, 32, 64 y 128 veces (pocillos 1-6 respectivamente) usando 5 µl de SSA marcado con AlexaFluor 488 50 µg/ml en el pocillo central (Fig. 4A- transiluminación de luz azul con filtro ámbar; Fig. 4B- epiiluminación de luz blanca frente a un fondo negro).

Los resultados del ensayo de IDD muestran las diferencias en la reactividad de diferentes cantidades de antígeno SSA marcado con diferentes diluciones del suero de un sujeto que contiene autoanticuerpos para SSA. Una reacción de precipitina transparente fue detectable con diluciones de suero de hasta 1:128.

Se muestra claramente en la Figura 4 la sensibilidad mejorada del procedimiento de IDD cuando se usa SSA marcado con fluorescencia seguido de transiluminación de luz azul. Usando SSA marcado con fluorescencia de molécula pequeña, pueden verse claramente bandas de precipitina a diluciones de suero de hasta 1:128. Esto se compara con el método tradicional de detección de bandas de precipitina formadas en ensayos de IDD usando epiiluminación de luz blanca frente a un fondo negro. En dichos métodos tradicionales, las bandas de precipitina se detectaron solamente a partir de diluciones en suero de un sujeto tan bajas como 1:16.

EJEMPLO 4: *Evaluación semicuantitativa de IDD fluorescente*

Las bandas de precipitina formadas por SSA marcado con fluorescencia de moléculas pequeñas unido con su anticuerpo afin en sueros del sujeto se evaluaron de forma semicuantitativa por exploración de imágenes de IDD fluorescentes usando el software BioRad Quantity One (BioRad, CA) (Fig. 5). La evaluación semicuantitativa por exploración de imágenes densitométricas se siguió de recuento de píxeles de la banda de precipitina. Las

exploraciones para sueros del sujeto que son 0, negativo; 1, positivo bajo; 2, positivo medio; 3, positivo alto para autoanticuerpos de SSA se muestran en la Fig. 5.

EJEMPLO 5: *Detección de anticuerpos anti SSA: comparación de métodos de IDD y ELISA*

El nivel de anticuerpos anti SSA se midió en 48 muestras de suero (incluyendo dos donantes sanos) por ELISA directo, usando SSA no marcado para recubrimiento (dilución 1:100, cada muestra medida por duplicado) como se describe para la Figura 2, y por IDD usando SSA marcado con AlexaFluor 488. Las placas de IDD se sellaron, se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 24 h y se detectaron bandas de precipitina fluorescentes usando transiluminación de luz azul. Las imágenes digitales obtenidas se cuantificaron usando software Quantity One (BioRad, CA) y se puntuaron como se ha descrito en el Ejemplo 4. La puntuación de IDD y absorbancia de ELISA se representaron para observar una buena correlación ($r^2 = 0,7107$) entre los dos métodos de medición de autoanticuerpos de SSA (Fig. 6).

Se evaluó un gran número de sueros de sujetos usando este procedimiento y se comparó con los resultados obtenidos usando el procedimiento de ELISA. Los resultados muestran que es en general una correlación amplia entre los dos métodos. En particular, la detección de anti SSA en sueros que proporcionaban mayores resultados de ELISA generalmente también proporcionó las bandas de precipitina más fuertes analizadas después del ensayo de IDD. Sin embargo, el método de IDD fluorescente no detectó la precipitación de anticuerpos en algunos sueros que proporcionaron resultados de ELISA más bajos lo que sugiere que (1) se evaluó incorrectamente por ELISA que estos sueros eran positivos para anticuerpos de SSA, o (2) IDD tiene menor sensibilidad que ELISA para la detección de anticuerpos de SSA.

EJEMPLO 6: *Detección de 6 anticuerpos anti ANE diferentes usando IDD fluorescente*

Se pipetearon muestras de suero no diluidas (5 μ l) en el mismo pocillo exterior (1-6) de 6 placas de IDD (Fig. 7). Las muestras de suero contenían autoanticuerpos de las siguientes especificidades: pocillo 1, anti-SSA y anti-SSB; pocillo 2, donante sano (sin autoanticuerpos); pocillo 3, anti-Jo-1; pocillo 4, anti-RNP/Sm; pocillo 5, anti-Sm; pocillo 6, anti-Scl-70 (Fig. 7). Se añadieron autoantígenos marcados con AlexaFluor 488 (5 μ l a 25 μ g/ml) al pocillo central de las placas de IDD de la siguiente manera: A, SSA; B, SSB; C, Jo-1; D, RNP/Sm; E, Sm, y F, Scl-70 (Fig. 7). Las placas de IDD se sellaron, se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 24 horas y se detectaron bandas de precipitina fluorescentes usando transiluminación de luz azul con filtro ámbar.

Los resultados muestran que pueden usarse AADMFMP de acuerdo con la invención para detectar una serie de autoantígenos siguiendo los métodos de la invención, conservando al mismo tiempo su selectividad y sensibilidad por sus autoanticuerpos afines. En particular, estos resultados muestran que puede usarse una serie de AADMFMP (es decir, SSA, SSB, RNP/Sm, Sm, Jo-1 y Scl-70) de acuerdo con la invención en un ensayo de IDD para detectar selectiva y específicamente sus autoanticuerpos afines respectivos en muestras de sujetos.

EJEMPLO 7: *Detección de 6 especificidades anti ANE diferentes usando CIE fluorescente*

Se considera que la contrainmunolectroforesis (CIE) es más rápida y sensible que IDD para la detección de precipitación de autoanticuerpos.

Se realizó contrainmunolectroforesis usando un gel de agarosa al 1,0 % con tampón de Tris-Tricina (pH 8,6). Se añadieron 10 μ l de muestras de suero no diluidas (1 donante sano y 3 que contenían autoanticuerpos para cada antígeno ensayado) a pocillos en el lado del ánodo de gel y se sometieron a electroforesis a 50 V durante 30 minutos (Fig. 8). Se añadieron después autoantígenos marcados con AlexaFluor 488 (5 μ l de 25 μ g/ml) a los pocillos del cátodo, que se separaron por 5 mm de las muestras de suero (Fig. 8). Los geles se sometieron a electroforesis durante 90 minutos adicionales (120 minutos para Jo-1) a 50 V y se detectaron bandas de precipitina fluorescentes usando transiluminación de luz azul. Se muestran los resultados de un donante sano (negativo) y tres muestras del sujeto con autoanticuerpos específicos para cada autoantígeno.

Los resultados de la detección de CIE de AADMFMP de acuerdo con la invención muestran que los autoantígenos marcados pueden usarse para detectar eficazmente autoanticuerpos del sujeto específicos para SSA, SSB, RNP/Sm, Sm, Jo-1 o Scl-70 usando este procedimiento.

EJEMPLO 8: *Detección de anticuerpos por contrainmunolectroforesis (CIE)*

Preparación de geles de agarosa para CIE

Se aplicó agarosa líquida caliente al área hundida de un molde (A) y después se superpuso GelBond (Lonza Rockland, Inc.) sobre ella (Figura 10). Una vez que se hubo solidificado la agarosa esta se adhirió al GelBond después de desprenderse del GelBond (B). Se formaron pocillos de muestra por protrusiones verticales en el centro del hueco del molde. Se aplicaron muestras de suero a los pocillos del ánodo más grandes (3 x 4 mm, 1 mm de

profundidad) mientras que se aplicaron autoantígenos marcados con AlexaFluor 488 a los pocillos del cátodo más pequeños (3 x 2 mm, 1 mm de profundidad). Los pocillos estaban a 5 mm de distancia.

Ciclo temporal para la detección de autoanticuerpos por CIE

Se añadieron un control negativo (tampón), un suero negativo y un suero de paciente que contenía autoanticuerpos anti SSA a los pocillos del ánodo de un gel de CIE (Figura 11). Después se añadió antígeno SSA marcado con AlexaFluor 488 al pocillo del cátodo enfrente de cada muestra y se llevó a cabo electroforesis a una corriente constante de 3 mA durante hasta 90 minutos. A diferentes intervalos temporales el gel se visualizó usando transiluminación de luz azul con un filtro ámbar. A los 9-12 minutos puede verse una banda de precipitina transparente con la muestra positiva que contiene autoanticuerpos de SSA pero no con el control negativo o con la muestra de suero negativo.

Los resultados de este ensayo de ciclo temporal muestran claramente que la detección de fluorescencia de autoanticuerpos de muestras de suero usando un ensayo de CIE de acuerdo con la invención se consigue en tan poco como 9 minutos. El tiempo requerido para detectar autoanticuerpos en una muestra del paciente se reduce por lo tanto significativamente en comparación con ensayos de IDD o ciertos otros protocolos de CIE. La detección rápida de autoanticuerpos usando este formato de CIE tiene numerosas ventajas para situaciones clínicas, incluyendo el potencial para su uso en detección en tiempo real y diagnóstico de enfermedad autoinmunitaria, es decir pueden tomarse muestras de pacientes y analizarse dentro de una única visita clínica.

Detección de autoanticuerpos a diferentes diluciones en suero usando CIE

Se añadieron un suero de control negativo y un suero de paciente que contenía autoanticuerpos anti SSA a diferentes diluciones que variaban de no diluido a 1:50 a los pocillos del ánodo de un gel de CIE (Figura 12). Después se añadió antígeno SSA marcado con AlexaFluor 488 al pocillo del cátodo enfrente de cada muestra y se llevó a cabo electroforesis a una corriente constante de 3 mA. A diferentes intervalos temporales el gel se visualizó usando transiluminación de luz azul con un filtro ámbar. Pueden verse bandas de precipitina claras con la muestra positiva que contiene autoanticuerpos de SSA incluso cuando está diluido 50 veces, pero no con el control negativo.

Detección de autoanticuerpos específicos para seis antígenos nucleares diferentes por contraimmunolectroforesis (CIE)

Se añadieron sueros de pacientes que contenían autoanticuerpos con las siguientes especificidades (de arriba a abajo-SSA, SSA/SB, Scl-70, Jo-1, Sm y RNP): a los pocillos del ánodo de seis geles de CIE diferentes (Figura 13). Después se añadieron autoantígenos marcados con AlexaFluor 488 (de izquierda a derecha) SSA, SSB, Scl-70, Jo-1, RNP/Sm y Sm a los pocillos del cátodo de cada gel. Se llevó a cabo electroforesis a una corriente constante de 3 mA durante 60 minutos. Usando transiluminación de luz azul con un filtro ámbar pueden verse bandas de precipitina específicas para cada especificidad de autoanticuerpo cuando el autoantígeno marcado correspondiente se aplica al pocillo del cátodo opuesto.

Basándose en los resultados anteriores que muestran la detección de seis autoanticuerpos diferentes específicos para 6 autoantígenos marcados con fluorescencia diferentes, el experto en la materia reconocerá que los métodos de inmunodetección de acuerdo con la invención, particularmente IDD o CIE, pueden emplearse con una amplia serie de antígenos marcados diferentes (y autoantígenos) para detectar sus anticuerpos afines.

Los ejemplos anteriores ilustran la práctica de la invención. Los expertos en la materia apreciarán que pueden realizarse numerosas variaciones y modificaciones sin alejarse del espíritu y alcance de la invención.

Las referencias citadas en la presente solicitud, incluyendo patentes, solicitudes publicadas y otras publicaciones, se incorporan por la presente por referencia.

La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular y similares, que están dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (J. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989); Current Protocols in Molecular Biology (F. Ausubel *et al.*, eds., 1987 actualizado); Essential Molecular Biology (T. Brown ed., IRL Press 1991); Gene Expression Technology (Goeddel ed., Academic Press 1991); Methods for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes (A. Bothwell *et al.* eds., Bartlett Publ. 1990); Gene Transfer and Expression (M. Kriegler, Stockton Press 1990); Recombinant DNA Methodology II (R. Wu *et al.* eds., Academic Press 1995); PCR: A Practical Approach (M. McPherson *et al.*, IRL Press at Oxford University Press 1991); Oligonucleotide Synthesis (M. Gait ed., 1984); Cell Culture for Biochemists (R. Adams ed., Elsevier Science Publishers 1990); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. Miller y M. Calos eds., 1987); Mammalian Cell Biotechnology (M. Butler ed., 1991); Animal Cell Culture (J. Pollard *et al.* eds., Humana Press 1990); Culture of Animal Cells, 2ª Ed. (R. Freshney *et al.* eds., Alan R. Liss 1987); Flow Cytometry and Sorting (M. Melamed *et al.* eds., Wiley-Liss 1990); the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Wirth M. y Hauser H. (1993); Immunochemistry in Practice, 3ª edición, A. Johnstone y R. Thorpe,

Blackwell Science, Cambridge, MA, 1996; Techniques in Immunocytochemistry, (G. Bullock y P. Petrusz eds., Academic Press 1982, 1983, 1985, 1989); Handbook of Experimental Immunology, (D. Weir y C. Blackwell, eds.); Current Protocols in Immunology (J. Coligan *et al.* eds. 1991); Immunoassay (E. P. Diamandis y T. K. Christopoulos, eds., Academic Press, Inc., 1996); Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2ª ed) Academic Press, Nueva York; Ed Harlow y David Lane, Antibodies A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1988; Antibody Engineering, 2ª edición (C. Borrebaeck, ed., Oxford University Press, 1995); y la serie Annual Review of Immunology; la serie Advances in Immunology.

El experto en la materia apreciará que la invención como se expone y se describe en el presente documento no está limitada solamente a los aspectos, las realizaciones y los ejemplos descritos, sino que también abarca dentro del alcance de la invención, las variaciones y modificaciones de la invención que resultaría evidentes para el experto en la materia (incluyendo el experto habitual en la materia) a la vista de las divulgaciones proporcionadas en el presente documento y el conocimiento general común.

En la presente memoria descriptiva en la que se ha hecho referencia a memorias descriptivas de patentes, otros documentos externos u otras fuentes de información, esto es generalmente para el fin de proporcionar un contexto para analizar las características de la invención. A no ser que se indique de otro modo específicamente, la referencia a dichos documentos externos no debe interpretarse como una admisión de que dichos documentos, o dichas fuentes de información, en ninguna jurisdicción, son técnica anterior, o forman parte del conocimiento general común de la técnica.

Referencias:

Laemmli UK 1970 Nature 227: pp. 680-685

Towbin *et al.* 1979 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: pp. 4350-4354

Charles PJ y Maini RN 1993 Man. Biol. Mark. Dis. A5: 1-23 (Kluwer Academic)

Bowie *et al.*, 1990, Science 247, 1306

Bunn C y Kveder T 1993 Man. Biol. Mark. Dis. A3: 1-12 (Kluwer Academic)

Deutscher 1990, Ed, Methods in Enzymology, Vol. 182, Guide to Protein Purification.

Kavanaugh *et al.* 2000 Arch. Pathol. Lab. Med. 124: pp. 71-81

Peene *et al.* 2001 Ann Rheum Dis 60: pp 1131-1136

El documento WO 92/06105 A1 Trigen Inc desvela un método para detectar autoanticuerpos anti antígeno de células beta pancreáticas de 64 kd usando autoantígeno de células beta marcado en condiciones que permiten la inmunoprecipitación. Ese marcador puede ser un fluorocromo.

Suzuki Y *et al.* "Immunoassay with Fluorescein-labelled Antigens - Device of a Method and its Clinical Application" JAPANESE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol 49, n.º 3, 1979, páginas 179-185 desvela albúmina de suero bovino (BSA) marcado con fluoróforo de molécula pequeña (fluoresceína) y ADN de timo de ternero marcado con fluoresceína (tipo 1) y uso de estos antígenos en la detección de anticuerpos específicos, incluyendo usando técnicas de inmunoprecipitación. Una aplicación es en la detección de anticuerpos de pacientes con enfermedad de LES.

El documento WO 00/17649 A1 Diachemix Corporation desvela péptidos marcados con fluoróforo de moléculas pequeñas (carboxifluoresceína) derivados de la proteína de la envoltura gp45 del virus de la Anemia Infecciosa Equina (VAIE) y su uso para detectar anticuerpos diana en una muestra de suero.

Schultz N. M. *et al.* "Rapid Immunoassays using Capillary Electrophoresis with Fluorescence Detection" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol 65, n.º 21, 1993, páginas 3161-3165 desvela insulina marcada con fluoróforo de molécula pequeña (fluoresceína) y el uso de esta en la detección de anticuerpos antiinsulina específicos.

Maeda H. "Assay of an Antitumour Protein, Neocarzinostatin and its Antibody by Fluorescence Polarization" CLINICAL CHEMISTRY, vol 24, n.º 12, 1978, páginas 2139-2144 desvela Neocarcinoestatina marcada con fluoróforo de molécula pequeña (fluoresceína) y el uso de este antígeno marcado en la detección de anticuerpos anti Neocarcinoestatina específicos en el suero de pacientes.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar en una muestra un autoanticuerpo diana contra los autoantígenos nucleares antígeno Jo-1, antígeno SSA (Ro60), antígeno SSB (La), antígeno Sm, antígeno de complejo Sm/RNP o antígeno Scl-70, comprendiendo el método:
 - i. poner en contacto la muestra con un autoantígeno diana marcado con un fluoróforo de molécula pequeña (AADMFMP) que se une específicamente con dicho autoanticuerpo diana y
 - ii. detectar la presencia del autoanticuerpo diana unido al AADMFMP por detección de fluorescencia,
 en el que el AADMFMP es un autoantígeno nuclear seleccionado del grupo que consiste en antígeno Jo-1, antígeno SSA (Ro60), antígeno SSB (La), antígeno Sm, antígeno de complejo Sm/RNP y antígeno Scl-70, en el que el componente fluoróforo del AADMFMP es menor de 5 kD.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra es una muestra clínica obtenida de un sujeto, en el que el método se realiza simultáneamente con controles que carecen de dichos autoanticuerpos diana o que contienen concentraciones conocidas de autoanticuerpos de control, en el que la muestra es una muestra de sangre, plasma o suero.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que la etapa de detección b) es detección de fluorescencia del AADMFMP en un inmunoprecipitado.
4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa de puesta en contacto a) se realiza usando un dispositivo de inmunodifusión, un dispositivo de microinmunodifusión, un dispositivo de contrainmunolectroforesis (CIE) o un dispositivo de microcontrainmunolectroforesis.
5. Uso en un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 de un AADMFMP de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el autoantígeno diana se aísla de un mamífero seleccionado del grupo que consiste en un ser humano, un primate no humano, una vaca, una oveja, un cerdo, una rata, un ratón o un perro.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el autoantígeno diana se ha aislado de una primera especie de mamífero y se une específica y selectivamente con un autoanticuerpo diana presente en una muestra obtenida de una especie diferente de mamífero.
7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el autoantígeno diana se ha aislado de una vaca o de una oveja y se usa para detectar un autoanticuerpo diana presente en una muestra obtenida de un ser humano.
8. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-7 de un AADMFMP, en el que el autoantígeno diana se ha expresado de forma recombinante a partir de una secuencia polinucleotídica que codifica el autoantígeno diana.
9. Uso en un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 de una composición que comprende un AADMFMP seleccionado del grupo que consiste en antígeno Jo-1, antígeno SSA (Ro60), antígeno SSB (La), antígeno Sm, antígeno de complejo Sm/RNP y antígeno Scl-70 y un vehículo o diluyente.
10. Uso en un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 de un kit que comprende
 - i. un AADMFMP seleccionado del grupo que consiste en antígeno Jo-1, antígeno SSA (Ro60), antígeno SSB (La), antígeno Sm, antígeno de complejo Sm/RNP y antígeno Scl-70;
 - ii. un dispositivo de inmunoprecipitación seleccionado del grupo que consiste en un dispositivo de inmunodifusión, un dispositivo de microinmunodifusión, un dispositivo de contrainmunolectroforesis y un dispositivo de microcontrainmunolectroforesis, y
 - iii. instrucciones para detectar el AADMFMP unido al autoanticuerpo diana.
11. Uso en un método para diagnosticar en un sujeto una enfermedad o un trastorno autoinmunitario seleccionado de enfermedad de tejido conectivo mixto, lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de Sjogren, esclerodermia, polimiositis, esclerosis sistémica, dermatomiositis, artritis reumatoide y síndrome de lupus neonatal de
 - i. un AADMFMP seleccionado del grupo que consiste en antígeno Jo-1, antígeno SSA (Ro60), antígeno SSB (La), antígeno Sm, antígeno de complejo Sm/RNP y antígeno Scl-70;
 - ii. una composición que comprende el AADMFMP anteriormente mencionado y un vehículo o diluyente; o
 - iii. un kit que comprende (a) el AADMFMP anteriormente mencionado, (b) un dispositivo de inmunoprecipitación seleccionado del grupo que consiste en un dispositivo de inmunodifusión, un dispositivo de microinmunodifusión, un dispositivo de contrainmunolectroforesis y un dispositivo de microcontrainmunolectroforesis y (c) instrucciones para detectar el AADMFMP unido al autoanticuerpo diana;

- a. poniendo en contacto una muestra obtenida del sujeto con dicho AADMFMP y
- b. detectando la presencia del autoanticuerpo diana unido al AADMFMP por detección de fluorescencia.

- 5 12. Uso de un AADMFMP seleccionado del grupo que consiste en antígeno Jo-1, antígeno SSA (Ro60), antígeno SSB (La), antígeno Sm, antígeno de complejo Sm/RNP y antígeno Scl-70 o una composición que comprende el AADMFMP anteriormente mencionado y un vehículo o diluyente en la fabricación de un agente para diagnosticar en un sujeto una enfermedad o un trastorno autoinmunitario seleccionado de enfermedad de tejido conectivo mixto, lupus eritematoso sistémico (SLE), síndrome de Sjogren, esclerodermia, polimiositis, esclerosis sistémica, dermatomiositis, artritis reumatoide y síndrome de lupus neonatal, comprendiendo el método:
 - 10 i. poner en contacto la muestra con dicho AADMFMP y
 - ii. detectar la presencia del autoanticuerpo diana por detección de fluorescencia del AADMFMP.
- 15 13. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la etapa de puesta en contacto a) se lleva a cabo por ensayo de inmunodifusión doble (IDD) o ensayo de contrainmunolectroforesis (CIE), y en el que el contacto en a) se realiza usando un dispositivo de inmunodifusión, un dispositivo de microinmunodifusión, un dispositivo de contrainmunolectroforesis (CIE) y un dispositivo de microcontrainmunolectroforesis.
- 20 14. Un método o uso de acuerdo con la reivindicación 13 en el que el ensayo de IDD es un ensayo de IDD asimétrico (IDDA) o en el que el ensayo de CIE es un ensayo de micro CIE y en el que el autoanticuerpo diana se detecta en una muestra de suero obtenida de un sujeto a una dilución de 1:1 a 1:256 o a una dilución de 1:8 a 1:128, o de 1:16 a 1:128, o de 1:32 a 1:128, o de 1:64 a 1:128, o a 1:128 (suero:diluyente).

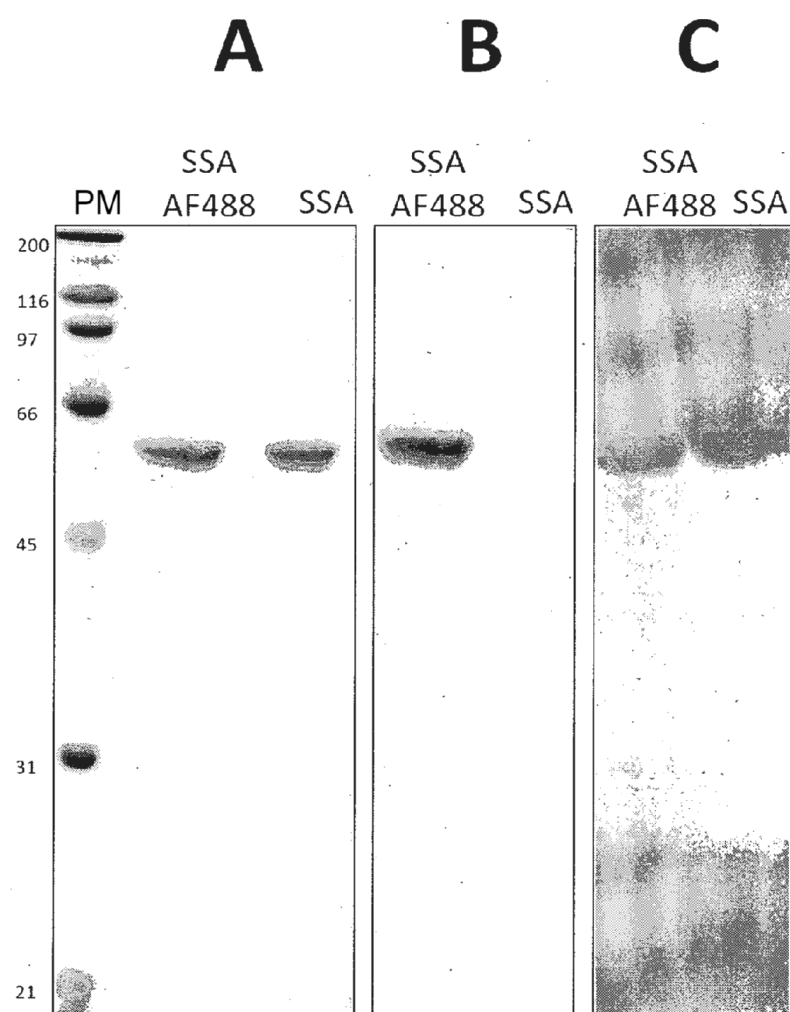


Figura 1

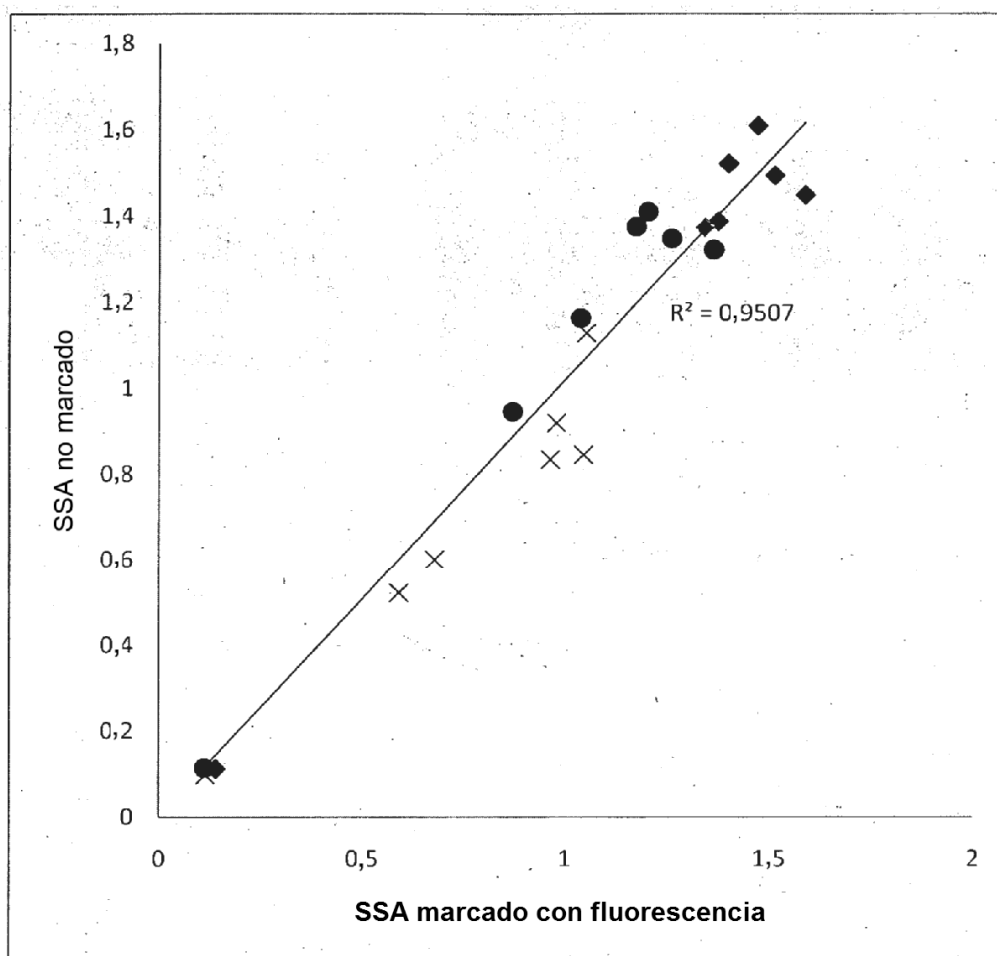


Figura 2

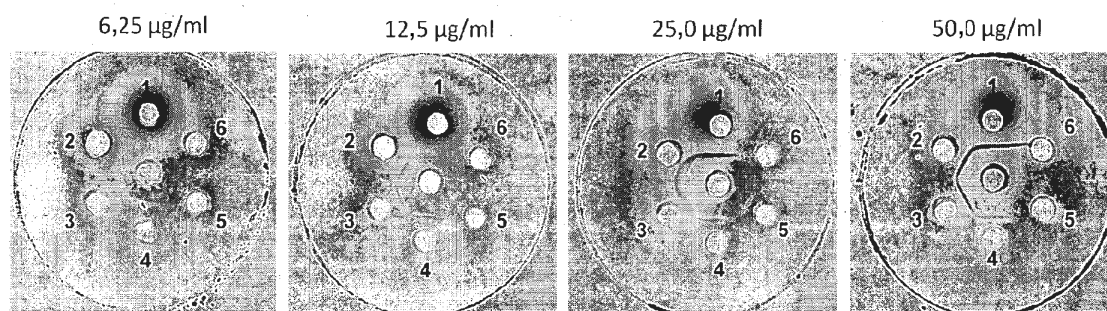


Figura 3

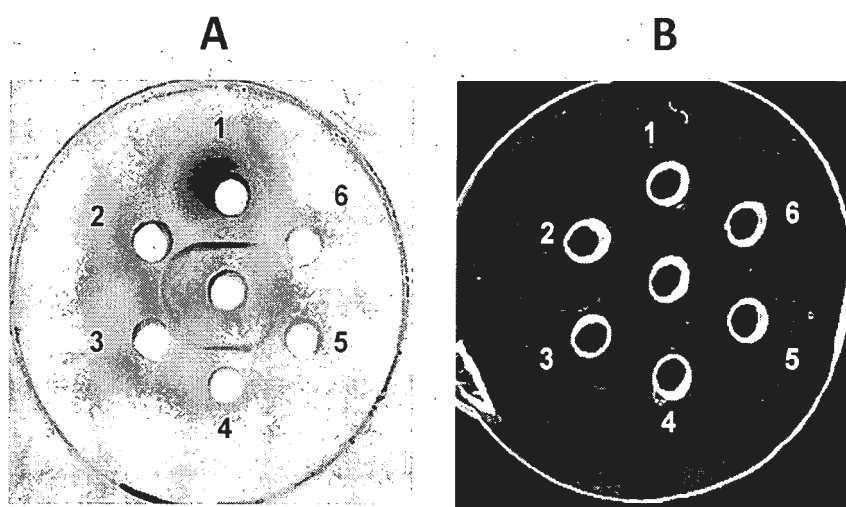


Figura 4

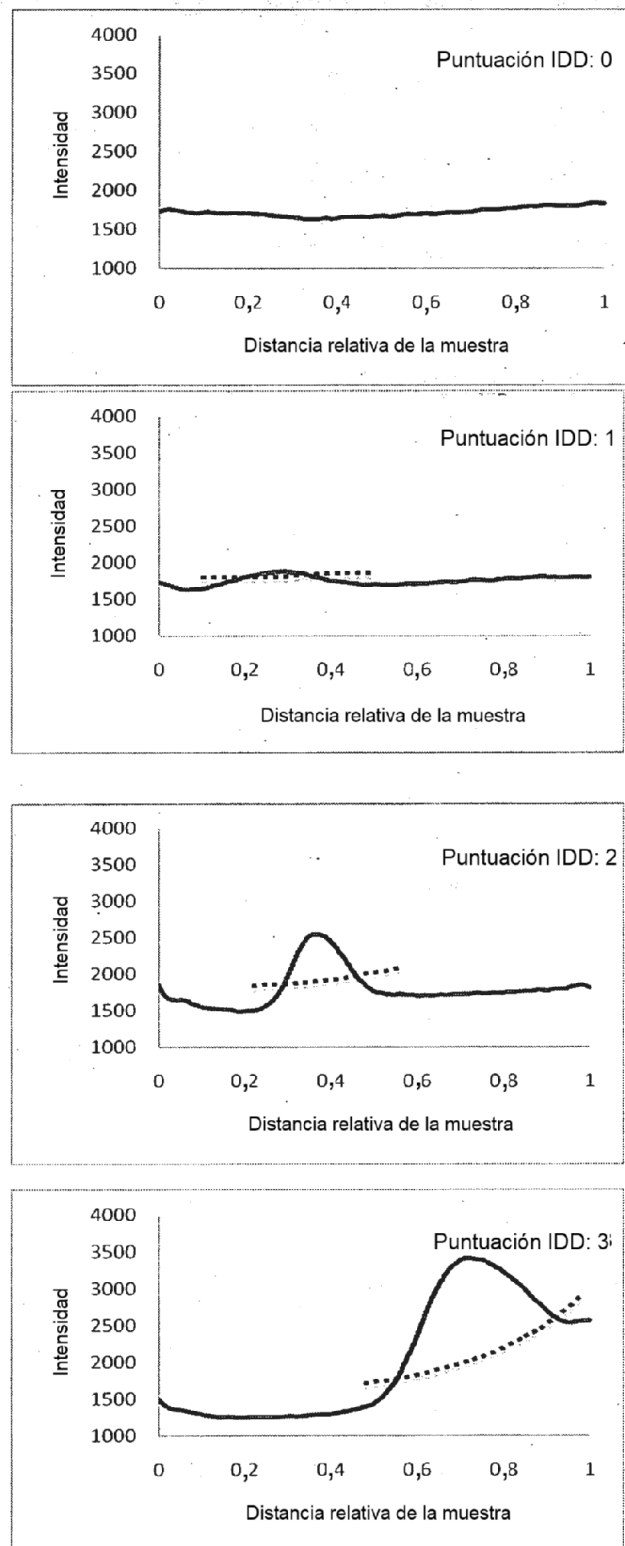


Figura 5

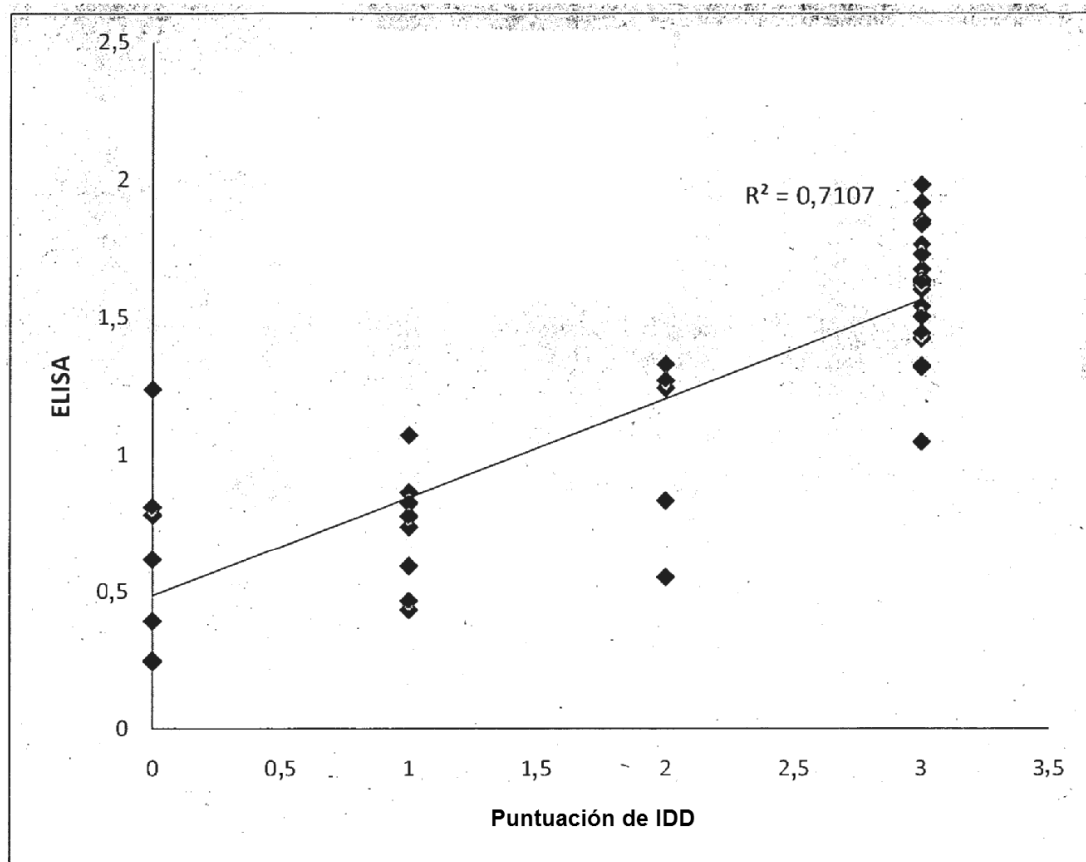


Figura 6

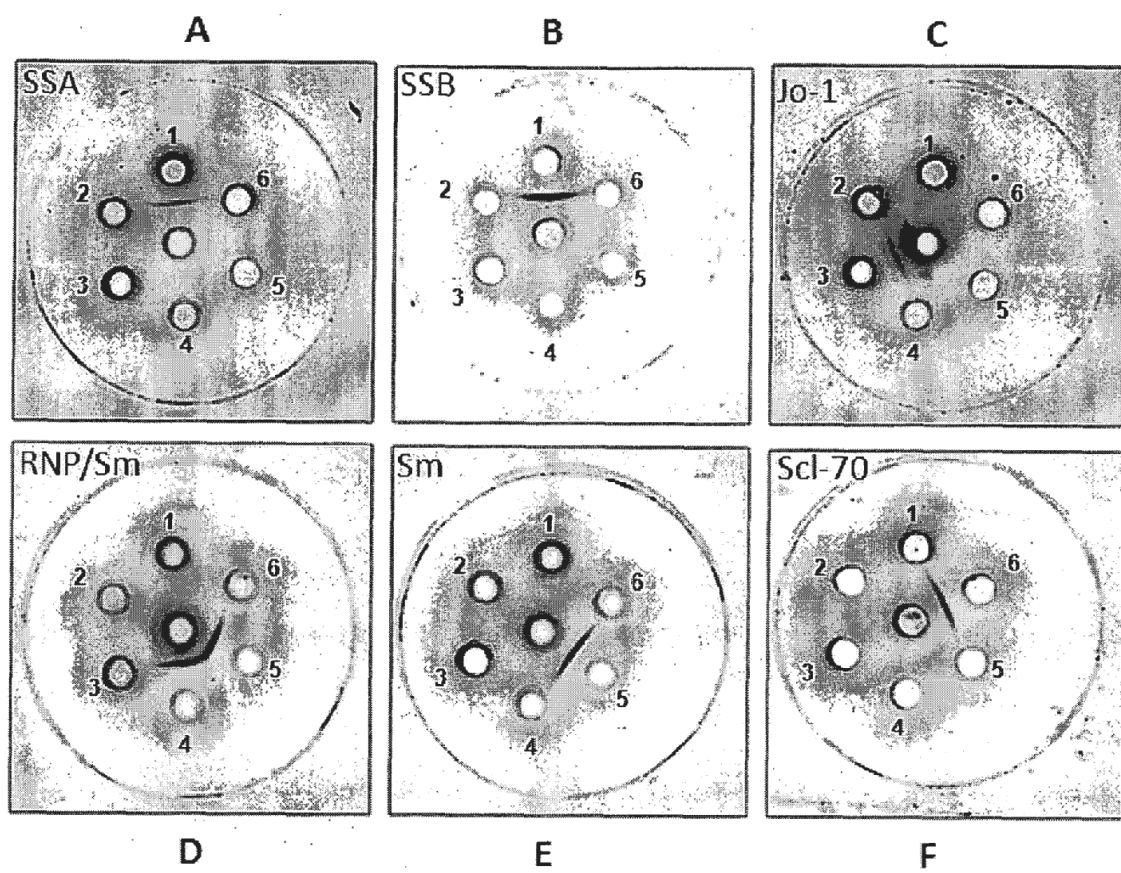


Figura 7

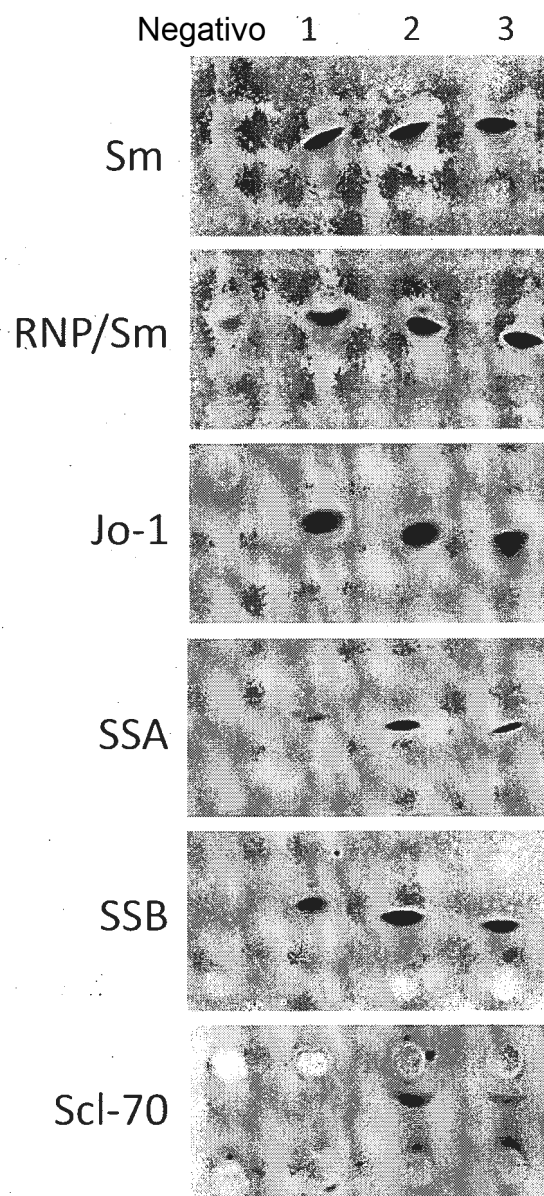


Figura 8

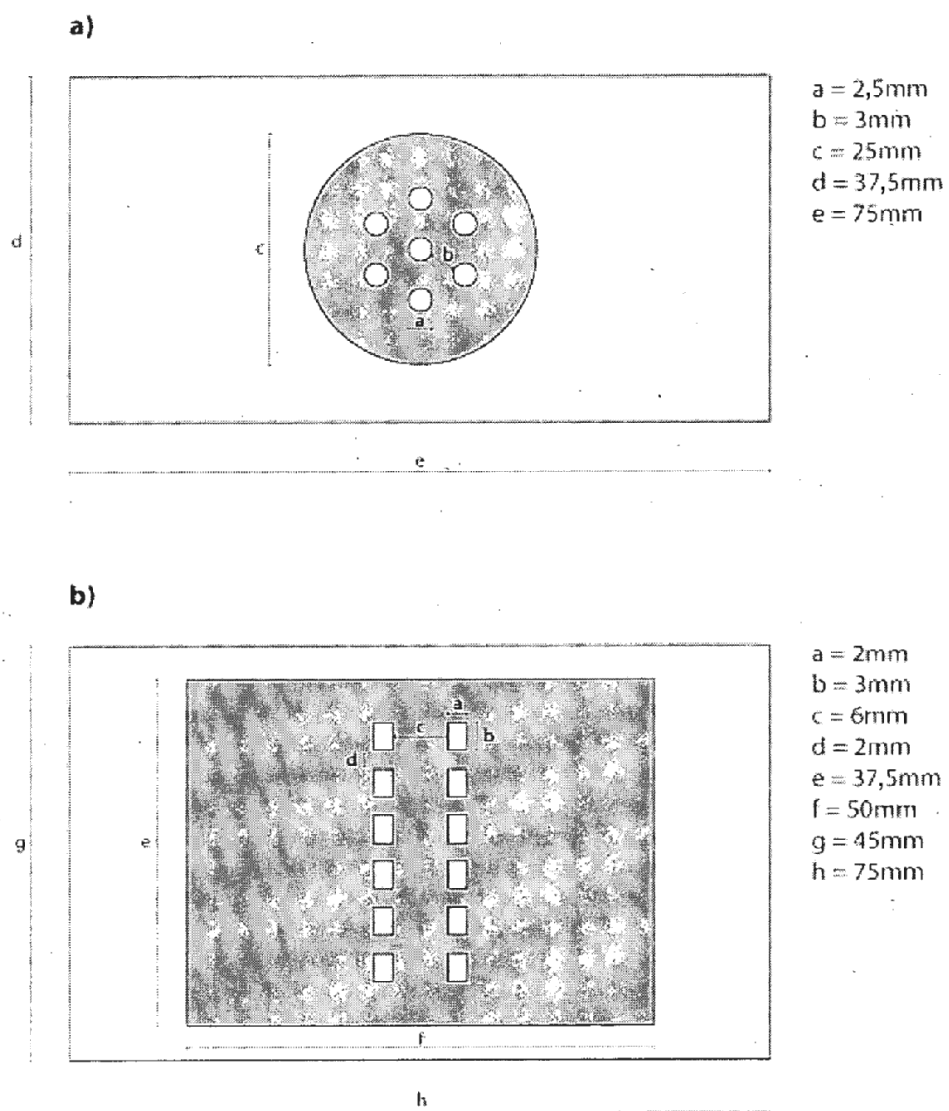


Figura 9

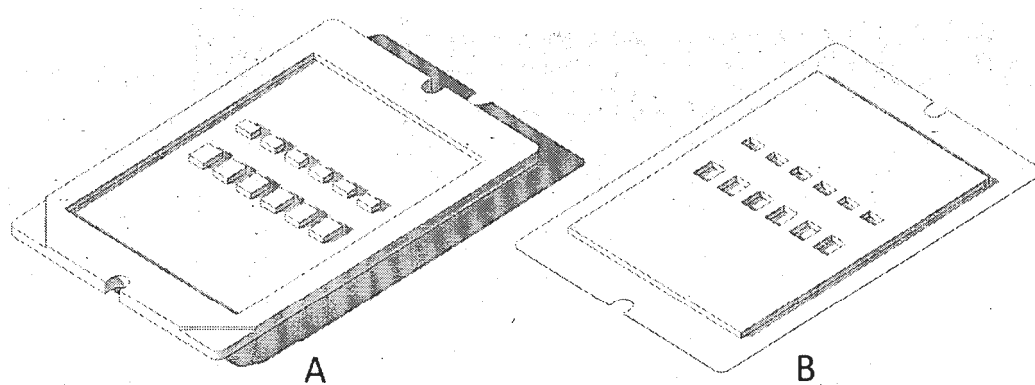


Figura 10

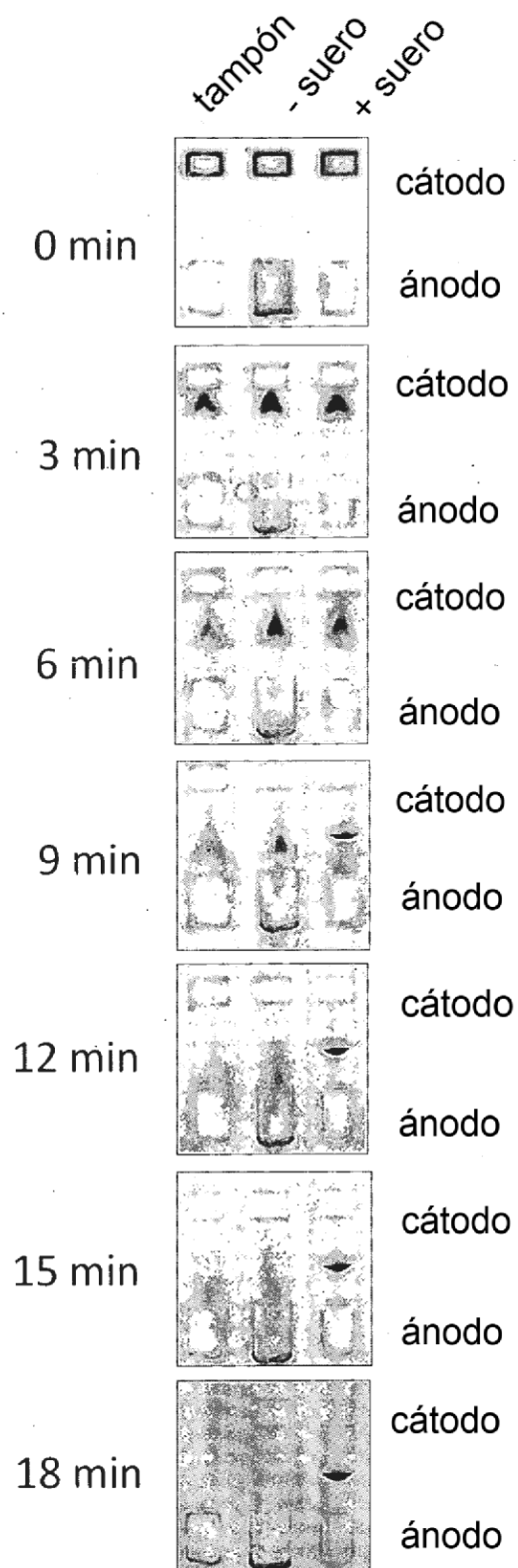


Figura 11

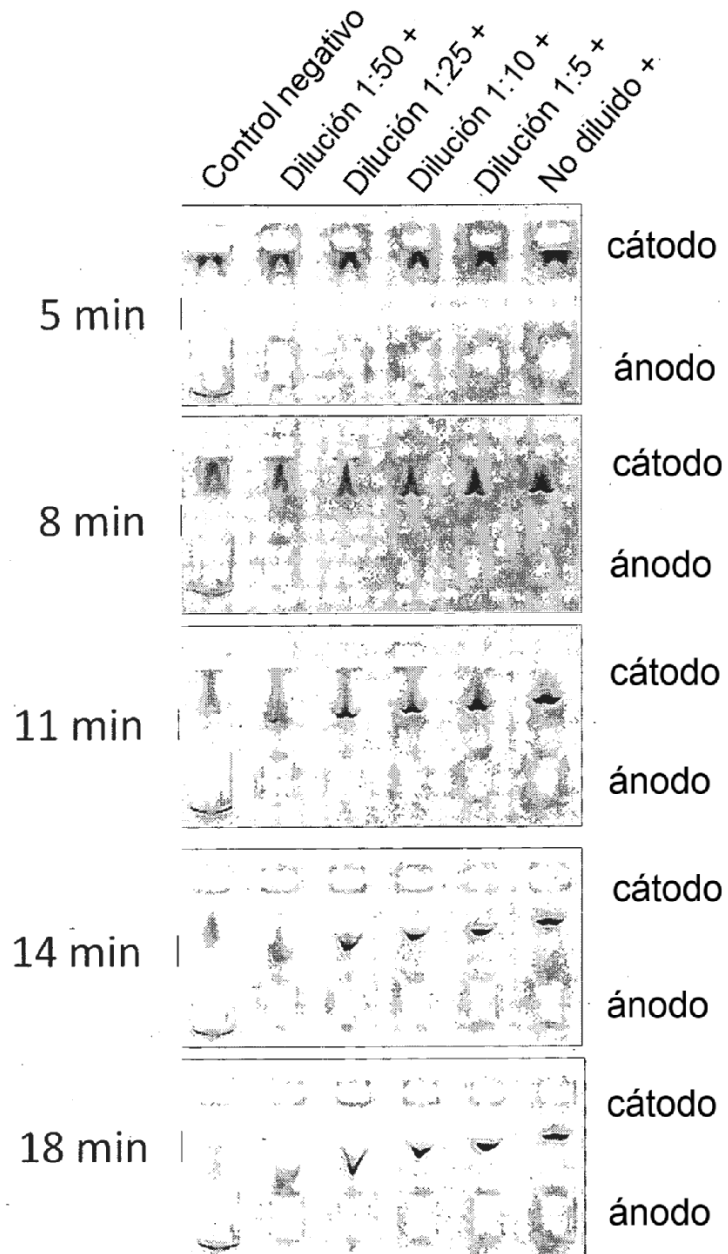


Figura 12

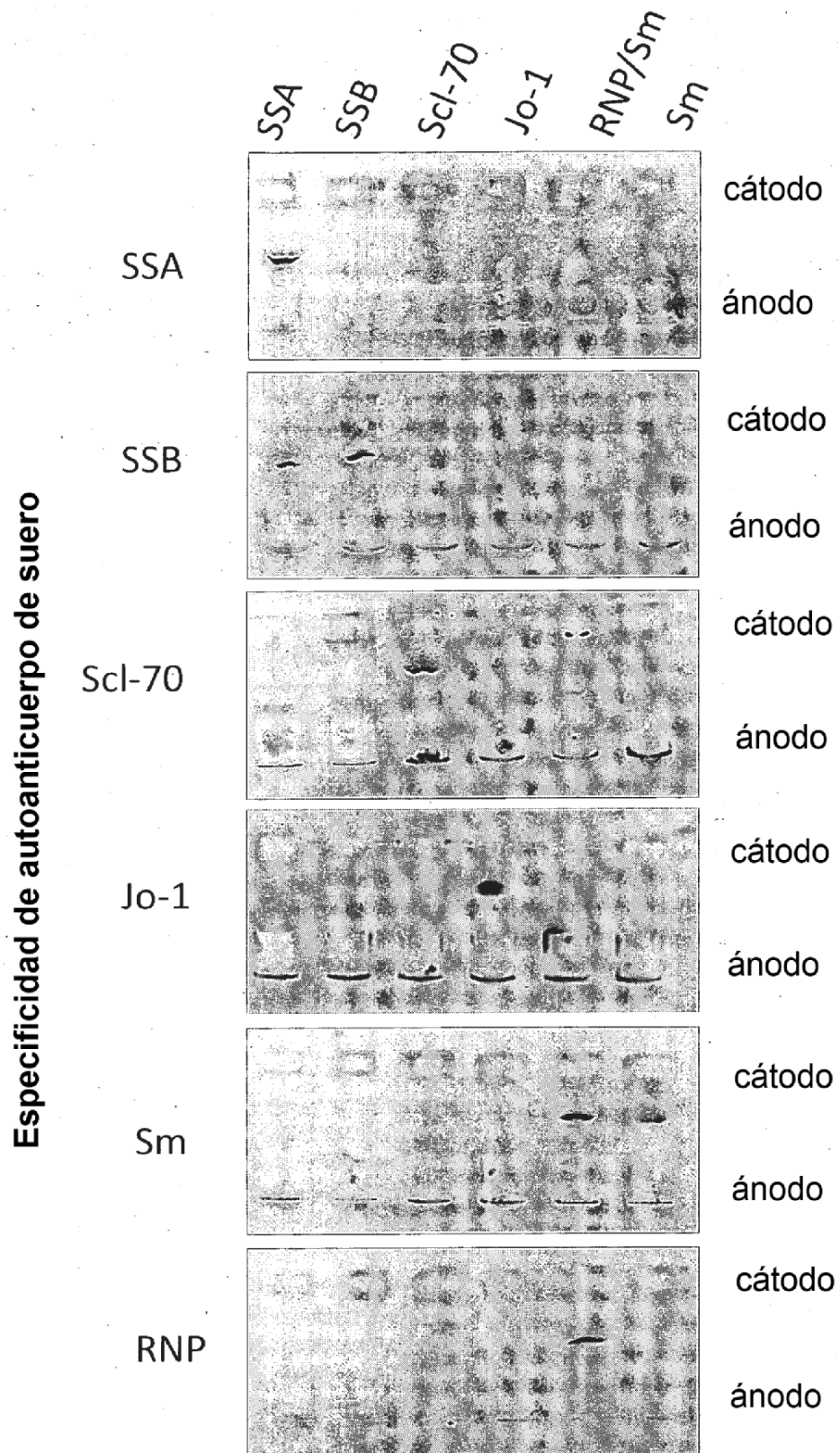


Figura 13