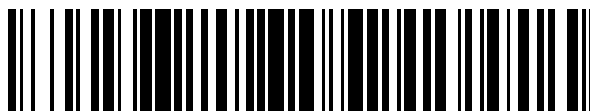


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 873**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2015** **E 15002253 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018** **EP 3124972**

54 Título: **Inmunodetección diagnóstica de autoanticuerpos para gangliósidos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.11.2018

73 Titular/es:
**EUROIMMUN MEDIZINISCHE
LABORDIAGNOSTIKA AG (100.0%)
Seekamp 31
23560 Lübeck, DE**

72 Inventor/es:
**SCHEPER, THOMAS y
MEYER, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 690 873 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

Immunodetección diagnóstica de autoanticuerpos para gangliósidos

La presente invención se refiere al uso de una albúmina aislada o una variante de la misma, que tiene actividad de unión a gangliósido para aumentar la sensibilidad de un ensayo para detectar autoanticuerpos a un gangliósido con el fin de diagnosticar una enfermedad, en el que el uso comprende las etapas de a) poner en contacto en una mezcla de reacción una muestra líquida que comprende anticuerpos de un sujeto con un gangliósido, b) detectar un complejo que comprende el gangliósido y un autoanticuerpo para el gangliósido, en la que la etapa a) se lleva a cabo en la presencia de una proteína de unión a gangliósido aislada, que es una albúmina o una variación de esta que tiene actividad de unión a gangliósido y en la que la etapa a) se realiza, en todo momento, a una temperatura de, al menos, 10 °C en la que se usa un dispositivo médico, que es una tira de transferencia.

Se ha aceptado ampliamente que los autoanticuerpos para glicolípidos están enlazados a diversas enfermedades neurológicas, tales como el síndrome de Guillain-Barré (GBS), la polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIPD), la neuropatía motora multifocal (MMN) y el síndrome de Miller Fisher (MFS) y afecciones relacionadas, y muchos ensayos disponibles comercialmente para el diagnóstico de estas enfermedades se centran alrededor de la detección de tales autoanticuerpos en muestras. Un resultado positivo sugiere que el sujeto es propenso a desarrollar o sufre de una enfermedad como tal (véase Willison, H. J., y Yuki, N. (2002): *Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies*, Brain 125, 2591-2625 para su revisión).

El estado de la técnica enseña una multitud de procedimientos que se pueden usar para detectar los autoanticuerpos diagnósticamente relevantes (véase Zane, H. D. (2001), *Immunology - Theoretical & Practical Concepts in Laboratory Medicine*, W. B. Saunders Company, en especial, en el Capítulo 14). Los ensayos basados en tiras de transferencia (Raoult, D., y Dasch, G. A. (1989), *The line blot: an immunoassay for monoclonal and other antibodies. Its application to the serotyping of gram-negative bacteria*. J. Immunol. Methods, 125 (1- 2), 57-65; WO2013041540) resultan especialmente convenientes, debido a que pueden llevarse a cabo y evaluarse tanto de una manera manual como de una manera automática.

Una tira de transferencia hecha a medida para la detección de autoanticuerpos contra gangliósidos se encuentra disponible en EUROIMMUN, Lübeck ("*Antibodies against gangliosides (IgG) - Test instruction for the Ganglioside Profile 2 EUROLINE*", publicado el 29 de octubre de 2013). Este producto comprende franjas de membrana que comprenden antígenos GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GT1b y GQ1b. De acuerdo con las instrucciones del fabricante, la tira de prueba debería incubarse con muestras diluidas de las que se sospecha que contienen autoanticuerpos para antígenos gangliósidos, a temperatura ambiente durante, al menos, 60 minutos, siguiendo, a continuación, la detección de cualquier autoanticuerpo de unión. Ensayos adicionales se describen por Vaishnavi C. et al., *Adv. Microbiol.* 2014, vol. 4, páginas 890-898 y por Caudie et al., *Clin. Lab.*, 2013, vol. 59, páginas 1277-1287.

Sin embargo, un problema común subyacente con respecto a todos los ensayos disponibles comercialmente se refiere a la inestabilidad intrínseca de reactivos y anticuerpos a ser detectados. Los gangliósidos son bien conocidos como compuestos muy lábiles. Cuando se mantienen a temperatura ambiente, pierden sus propiedades antigénicas (Asati, A., Kachurina, O., y Kachurin, A. (2012), *Simultaneous Measurements of Auto-Immune and Infectious Disease Specific Antibodies Using a High Throughput Multiplexing Tool*. PLOS ONE 7 (8), e42681). Anticuerpos anti-gangliósido en suero tienen estabilidad térmica limitada, debido a lo cual el ensayo se realiza normalmente a 4 °C (Willison, H. J. (2007), *Ganglioside Autoantibodies*. Autoantibodies 611-618), en especial, la formación del complejo anticuerpo-antígeno.

La inestabilidad térmica de los reactivos presenta usuarios con problemas significativos. La mezcla de ensayo tiene que refrigerarse durante períodos de tiempo prolongados. Esto no solo es un inconveniente sino que también requiere equipo de laboratorio sofisticado, incluyendo una unidad de refrigeración y conduce a un aumento del consumo de energía, mientras que una falta de refrigeración rigurosa, por ejemplo, debido a un mal funcionamiento o condiciones de clima o climáticas extremas, puede comprometer la reproducibilidad y confianza de la prueba.

El problema subyacente con respecto a la presente invención se refiere a superar cualquier problema que se asocia con los ensayos de diagnóstico del estado de la técnica que se basan en la detección de autoanticuerpos para gangliósidos.

Más específicamente, un problema subyacente con respecto a la presente invención se refiere a proporcionar un ensayo de diagnóstico que tiene un alto grado de sensibilidad, que resulta incluso fácil de correr de manera automática, con tan pocas etapas y cambios diferentes como sea posible. Los resultados fiables deberían obtenerse con cualquier tipo de muestra, entre las que se incluyen las muestras de aféresis.

Otro problema subyacente con respecto a la presente invención se refiere a proporcionar un ensayo de diagnóstico que es rápido y de bajo consumo y que puede llevarse a cabo donde no hay instalaciones de refrigeración disponibles, pero que incluso resulta confiable, en especial, en términos de sensibilidad.

Otro problema subyacente con respecto a la presente invención se refiere a proporcionar un ensayo de diagnóstico menos dependiente de condiciones y cambios climáticos en comparación con aquellos que se describen en el estado de la técnica.

5 Otro problema subyacente con respecto a la presente invención se refiere a proporcionar un ensayo de diagnóstico confiable que no requiere ningún cambio de temperatura, en especial, ninguna refrigeración luego de la preparación de los reactivos de ensayo y muestras.

10 El problema subyacente con respecto a la presente invención se resuelve mediante el objeto de las reivindicaciones independientes y dependientes adjuntas.

El problema subyacente con respecto a la presente invención se resuelve mediante un uso de una albúmina aislada o una variante de esta que tiene actividad de unión a gangliósido para aumentar la sensibilidad de un ensayo para
15 detectar autoanticuerpos para un gangliósido con el fin de diagnosticar una enfermedad, en la que el uso comprende las etapas de a) poner en contacto en una mezcla de reacción una muestra líquida que comprende anticuerpos de un sujeto con un gangliósido, b) detectar un complejo que comprende el gangliósido y un autoanticuerpo con respecto al gangliósido, en el que la etapa a) se lleva a cabo en la presencia de una proteína de unión a gangliósido aislada, que es una albúmina o una variación de esta que tiene actividad de unión a gangliósido y en la que la etapa
20 a) se realiza, en todo momento, a una temperatura de, al menos, 10 °C en la que se usa un dispositivo médico, que es una tira de transferencia.

En una realización preferida de cualquier aspecto de la presente invención, el gangliósido se selecciona a partir del grupo que comprende GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GT1a, GT1b y GQ1b.

25 En una realización preferida, la proteína de unión a gangliósido se presenta en una concentración del 0,001 al 5 %, más preferiblemente, del 0,005 al 1 %, más preferiblemente, del 0,01 al 1 %.

30 En una realización preferida, el procedimiento, preferiblemente la etapa a), se realiza, o la mezcla de reacción, complejo o dispositivo médico se encuentra o se mantiene a una temperatura de entre 15 a 37 °C, preferiblemente de entre 18 a 34 °C, más preferiblemente, de entre 18 a 30 °C.

En una realización preferida, la mezcla de reacción se mantiene, mientras que el procedimiento, preferiblemente la etapa a), se realiza a una temperatura de, al menos, 10, más preferiblemente, 12, 15 o 18 °C en todo momento.

35 En una realización preferida, el gangliósido se inmoviliza, preferiblemente en un dispositivo médico, que es una tira de transferencia. En una realización preferida, la muestra líquida se pone en contacto con o la tira de transferencia comprende, preferiblemente en una forma inmovilizada, dos o más, preferiblemente tres o más, preferiblemente todos los gangliósidos a partir del grupo que comprende GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GT1a, GT1b y GQ1b.

40 En una realización preferida, el procedimiento, mezcla de reacción, complejo o tira de transferencia es para el diagnóstico de una enfermedad neurológica, preferiblemente una neuropatía, más preferiblemente, seleccionada a partir del grupo que comprende GBS, CIPD, MMN y MFS.

45 En una realización preferida, el complejo se detecta usando un procedimiento a partir del grupo que comprende determinación de radioactividad, actividad enzimática, en especial, detección colorimétrica de actividad enzimática, fluorescencia, espectrometría, en especial UV/vis, EPR o espectroscopía RMN, aglutinación o quimioluminiscencia.

50 La presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente de los inventores de que la sensibilidad del ensayo se mejora si las proteínas de unión a gangliósido se presentan a medida que el antígeno se pone en contacto con la muestra que comprende anticuerpos. Los inventores teorizan que el contacto con una proteína de unión a gangliósido induce a que los gangliósidos, en especial, el gangliósido recubierto con una tira de prueba, adopten una conformación que se asocia con una afinidad aumentada por autoanticuerpos diagnósticamente relevantes.

55 Resulta esencial que la muestra que se usa para poner en práctica la presente invención comprende anticuerpos, también referidos como inmunoglobulinas. Normalmente, la muestra es un fluido corporal que comprende un conjunto representativo de la totalidad de las inmunoglobulinas del sujeto. Sin embargo, la muestra, una vez que se proporciona, puede someterse a procesamiento adicional que puede incluir fraccionamiento, centrifugación,
60 enriquecimiento o aislamiento de la totalidad de inmunoglobulinas o cualquier clase de inmunoglobulina del sujeto, que puede afectar la distribución relativa de inmunoglobulinas de las diversas clases. La muestra puede seleccionarse a partir del grupo que comprende sangre entera, suero, líquido cefalorraquídeo y saliva y, preferiblemente es suero.

65 El procedimiento de fondo con respecto al uso de acuerdo con la presente invención comprende las etapas de a) poner en contacto en una mezcla de reacción una muestra líquida que comprende anticuerpos de un sujeto con un gangliósido y b) detectar un complejo que comprende el gangliósido y un autoanticuerpo para el gangliósido, en el

que la etapa a) se lleva a cabo en la presencia de una proteína de unión a gangliósido aislada. La etapa a) requiere configurar la mezcla de reacción que incluye la muestra que comprende anticuerpos y el gangliósido e incubarla a una temperatura, bajo condiciones que resultan compatibles con la unión del anticuerpo al gangliósido lo suficientemente larga como para permitir la formación del complejo, por ejemplo, durante, al menos, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 minutos o durante la noche, preferiblemente durante, al menos, 30 minutos, más preferiblemente, al menos, 60 minutos. Posteriormente, cualquier complejo que se forma puede separarse del resto de la muestra, por ejemplo, al retirar la mezcla de reacción líquida a partir de un gangliósido inmovilizado. Seguidamente, para mayor confianza, puede retirarse la muestra restante mediante una o más etapas de lavado usando un tampón de lavado que puede comprender la proteína de unión a gangliósido. Finalmente, cualquier complejo puede detectarse usando diversos procedimientos que se describen en el estado de la técnica.

De acuerdo con la presente invención, el procedimiento de fondo con respecto al uso de acuerdo con la presente invención, en especial, la etapa a) se lleva a cabo en la presencia de una proteína de unión a gangliósido aislada. En una realización preferida, el término proteína de unión a gangliósido "aislada" se refiere a una proteína de unión a gangliósido que no es una proteína de unión a gangliósido endógena del sujeto que donó la muestra y que se ha agregado a la muestra, ya sea mientras o antes de la configuración de la mezcla de reacción. En una realización más preferida, la proteína de unión a gangliósido "aislada" es una proteína purificada a partir de un tejido que incluye sangre, preferiblemente, un tejido de mamífero, o el uso de procedimientos recombinantes, de manera tal que fue, al menos, un 30, 50, 75, 80, 90, 95 o 99 % pura antes de la adición a la muestra, preferiblemente, según se evalúa mediante inspección visual de un gel para SDS PAGE seguida de tinción con azul de Coomassie. En otra realización preferida, la proteína de unión a gangliósido aislada proviene de otro organismo con respecto a la muestra que se analiza. En una realización preferida, la proteína de unión a gangliósido constituye al menos, el 30, 50, 75, 80, 90, 95 o 99 % de la proteína aislada total que se presenta en la muestra durante la etapa a).

La mezcla de reacción es una solución acuosa que proporciona condiciones compatibles con la formación de un complejo antígeno-anticuerpo, más preferiblemente, un complejo que comprende un autoanticuerpo para un gangliósido y un gangliósido. Se han descrito condiciones adecuadas en el estado de la técnica que comprenden, por ejemplo, tampón salino tamponado con fosfato.

El complejo que comprende un gangliósido y un autoanticuerpo para el gangliósido puede obtenerse usando procedimientos que se describen en el estado de la técnica para la purificación de tales complejos. El autoanticuerpo o complejo puede purificarse a partir de muestras que se toman de pacientes que sufren de una enfermedad neurológica que comprende GBS, CIPD, MMN y MFS. En una realización preferida, el término "purificado", según se usa en la presente, significa que el complejo se enriquece de manera tal que, en comparación con su medio ambiente endógeno, se presenta una cantidad más pequeña de proporción de otros polipéptidos, más preferiblemente, anticuerpos. En una realización más preferida, esto significa que el complejo es, al menos, un 50, preferiblemente, 60, 70, 80, 90 o 99 % puro según se evalúa mediante SDS PAGE seguida de tinción con azul de Coomassie e inspección visual.

De acuerdo con la presente invención, un dispositivo médico o de diagnóstico, que es una tira de transferencia, comprende y se recubre, preferiblemente, con uno o más de un gangliósido. Preferiblemente, un dispositivo médico o de diagnóstico como tal comprende el gangliósido en una forma que permite el contacto de este con una solución acuosa, más preferiblemente, la muestra humana líquida, de una manera directa. En especial, el gangliósido puede inmovilizarse en la superficie de un dispositivo. El dispositivo médico o de diagnóstico puede comprender uno o más de un antígeno adicional, uno o más de un control, tal como un control positivo o negativo, o uno o más de un antígeno conocido que se relaciona con otras enfermedades que se asocian con uno o más síntomas idénticos o similares. Un control puede ser un control positivo que confirma que se ha agregado suero o un reactivo de diagnóstico al ensayo. La invención contempla un uso de una proteína de unión a gangliósido, que es una albúmina aislada o variante de unión a gangliósido de esta, para aumentar la sensibilidad de un ensayo para detectar autoanticuerpos para un gangliósido con el fin de diagnosticar una enfermedad. El ensayo puede comprender las etapas que se llevarán a cabo en línea con el procedimiento inventivo. Además, el ensayo, más preferiblemente, la etapa a) puede realizarse a una temperatura de entre 15 a 37 °C, preferiblemente de entre 18 a 34 °C, más preferiblemente, de entre 18 a 30 °C y/o mantenerse a una temperatura de, al menos, 10, más preferiblemente, 12, 15 o 18 °C en todo momento, en el que, en una realización preferida, el término "en todo momento" se refiere al período que comienza con la preparación de los reactivos de ensayo y materiales, más preferiblemente, el período que comienza con el contacto inicial de muestra y gangliósido, más preferiblemente, el período entre el contacto inicial de muestra y gangliósido y adición de un reactivo para la detección del complejo que comprende gangliósido y autoanticuerpo, más preferiblemente, el período entre contacto inicial de muestra y gangliósido y el retiro de la muestra.

Preferiblemente, el gangliósido se selecciona a partir del grupo que comprende GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GT1a, GT1b y GQ1b, preferiblemente, GM1. En una realización más preferida, se usa una combinación de dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, o la totalidad de los gangliósidos que se seleccionan a partir del grupo que comprende GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GT1a, GT1b y GQ1b.

La variante de unión a gangliósido de albúmina es una proteína que resulta capaz de unirse a un gangliósido que se selecciona del grupo que comprende GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GT1a, GT1b y GQ1b, preferiblemente, GM1, cuya unión puede detectarse mediante filtración con gel y detección UV a 280 nm, siendo reemplazable el procedimiento de detección, lo que depende de las propiedades de absorción de la proteína, al someter las fracciones recolectadas a SDS PAGE y tinción con plata, usando, preferiblemente, la metodología y bajo las condiciones que se describen por Tomas, M., Road, L. G., Ausiello, C., D'Agnolo, G., Venerando, B., Ghidoni, R., Sonnino, S., y Tettamanti, G. (1980) Interaction of GM1 Ganglioside with Bovine Serum Albumin Formation and Isolation of Multiple Complexes, Eur. J. Biochem. 111, 315-324, página 317.

La proteína de unión a gangliósido aislada es una albúmina o una variante de unión a gangliósido de esta, preferiblemente, albúmina de mamífero o variante de esta, preferiblemente, albúmina de suero bovino, (BSA, más preferiblemente, BSA que se representa mediante el código de base de datos CAA76847.1, que, como todos los códigos de base de datos a los que se hace referencia a lo largo de esta solicitud, se refiere a las bases de datos NCBI como figuran en línea en la fecha de la prioridad de esta solicitud) o variante de esta, se presenta en una concentración del 0,001 al 5 %, más preferiblemente, del 0,005 al 1 %, más preferiblemente, del 0,01 al 1% (peso/volumen), en la que, de manera opcional, una o más de una proteína diferente de unión a gangliósido aislada puede reemplazar parte de la proteína de unión a gangliósido aislada. Preferiblemente, la concentración se mide mediante SDS-PAGE de la muestra seguida de tinción con azul de Coomassie y comparación visual con respecto a bandas de cantidades conocidas de la proteína o proteínas o una variante de estas que se cargan y se corren en el mismo gel.

Sin embargo, las enseñanzas de la presente invención pueden llevarse a cabo no solo usando polipéptidos, en especial, BSA que tiene las secuencias exactas a las que se hace referencia en esta solicitud de manera explícita, por ejemplo, por función, nombre, número de adhesión o secuencia, o de manera implícita, sino que también usando variantes de tales polipéptidos o ácidos nucleicos.

En una realización preferida, el término "variante" según se usa en la presente, puede referirse a, al menos, un fragmento de la secuencia de longitud total referida, más específicamente, una o más secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos que se encuentran truncadas, con respecto a la secuencia de longitud total, en una o ambas terminales por uno o más aminoácidos. Tal fragmento comprende o codifica un péptido que tiene, al menos, 25, 50, 75, 100, 150 o 200 aminoácidos sucesivos de la secuencia original o una variante de este. La longitud total de la variante puede ser de 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos.

En otra realización preferida, el término "variante" se refiere no solo a, al menos, un fragmento, sino que también a un polipéptido o un fragmento de este que comprende secuencias de aminoácidos, preferiblemente, un fragmento que comprende, al menos, 25, más preferiblemente, 50, más preferiblemente 200 aminoácidos sucesivos, que son, al menos, en un 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idénticos con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia referida o el fragmento de esta, en la que, los aminoácidos distintos a aquellos esenciales para la actividad biológica, por ejemplo, la capacidad de unirse a un gangliósido, o el repliegue o estructura del polipéptido se eliminan o sustituyen y/o uno o más de tales aminoácidos esenciales se reemplazan de manera conservadora y/o se agregan aminoácidos de manera tal que la actividad biológica del polipéptido se conserva. El estado de la técnica comprende diversos procedimientos que pueden usarse para alinear dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos dadas y para calcular el grado de identidad, véase, por ejemplo, Arthur Lesk (2008), Introduction to bioinformatics, Oxford University Press, 2008, 3ra. edición. En una realización preferida, se usa el ClustalW software (Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. (2007). Clustal W y Clustal X version 2.0. Bioinformatics, 23, 2947-2948), usando configuraciones predeterminadas.

En una realización preferida, las variantes pueden, de manera adicional, comprender modificaciones químicas, por ejemplo, etiquetas isotópicas o modificaciones covalentes tales como glicosilación, fosforilación, acetilación, descarboxilación, citrulinación, hidroxilación y similares. La persona capacitada en la técnica está familiarizada con procedimientos para modificar polipéptidos. Cualquier modificación se designa de manera tal que no suprime la actividad biológica de la variante.

Además, las variantes pueden generarse también mediante fusión con otros polipéptidos conocidos o variantes de estos y comprenden porciones activas o dominios, que tienen, preferiblemente, una identidad de secuencia de, al menos, el 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % cuando se alinean con la porción activa de la secuencia de referencia, en las que el término "porción activa", según se usa en la presente, se refiere a una secuencia de aminoácidos que es menor con respecto a la secuencia de aminoácidos de longitud completa.

La variante de la albúmina tiene la capacidad de unirse a un gangliósido, preferiblemente, de manera tal que resulta, más preferiblemente cuando se inmoviliza, más adecuada para la detección de un autoanticuerpo en una muestra. La etapa a) se realiza o los dispositivos y reactivos se encuentran a una temperatura de, al menos, 10 °C, se mantienen a una temperatura de, al menos, 10 °C, preferiblemente, a una temperatura de entre 10 a 40 °C, preferiblemente, de entre 15 a 37 °C, preferiblemente, de entre 18 a 34 °C, más preferiblemente, de entre 18 a 30 °C, de mayor preferencia, de entre 20 a 25 °C. En una realización preferida, las etapas a) y b) se llevan a cabo sin

ninguna refrigeración con respecto a la temperatura ambiente, más preferiblemente, en ausencia de una unidad de refrigeración. En una realización preferida, el término “temperatura ambiente”, según se usa en la presente, se refiere a la temperatura de rutina del lugar en el que se realiza el ensayo y es de, más preferiblemente, 20 a 25 °C, de mayor preferencia, de 20 °C.

En otra realización preferida, la etapa a) se realiza o los dispositivos y reactivos a temperatura ambiente, mantenida, preferiblemente, a una temperatura de, al menos, 10, más preferiblemente 12, 15 o 18 °C en todo momento. En una realización más preferida, en este contexto la etapa a) comienza con el contacto inicial entre la muestra y el gangliósido y concluye con la adición de un reactivo analítico de unión al anticuerpo de unión al gangliósido, más preferiblemente, con el retiro parcial o total de la muestra.

El objetivo de los usos puede ser proporcionar información diagnósticamente relevante, más específicamente, la determinación de la presencia de anticuerpos, preferiblemente, autoanticuerpos para un gangliósido en una muestra de un paciente. El paciente puede tener otros síntomas, en especial, síntomas clínicos que sugieren que puede sufrir de una enfermedad neurológica. El estado de la técnica enseña cómo puede usarse tal información para el diagnóstico de una enfermedad neurológica, por ejemplo, Willison, H. J., y Yuki, N. (2002): *Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies*, *Brain* 125, 2591-2625.

En una realización preferida, el término “diagnóstico”, según se usa en la presente, se refiere a cualquier clase de procedimiento orientado a obtener información instrumental en la evaluación con respecto a si un paciente sufre o es propenso o más propenso a, en comparación con el promedio o un sujeto comparativo, teniendo este último, de preferencia, los mismo síntomas, sufrir de una cierta enfermedad o desorden en el pasado, al momento del diagnóstico o en el futuro, para descubrir cómo evoluciona la enfermedad o como es probable que evolucione en el futuro o para evaluar la capacidad de respuesta de un paciente en cuanto a un tratamiento determinado, por ejemplo, la administración de medicamentos inmunosupresores. En otras palabras, el término “diagnóstico” comprende no solo la acción de diagnosticar, sino que también la acción de pronosticar y/o monitorear el curso de una enfermedad o desorden.

La enfermedad neurológica es, preferiblemente, una neuropatía, más preferiblemente, una que se selecciona del grupo que comprende GBS, CIPD, MMN y MFS, más preferiblemente GBS.

En una realización preferida, el gangliósido es un gangliósido inmovilizado. De esta manera, el gangliósido inmovilizado, junto con el transportador insoluble al cual se encuentra adosado PARR41, puede separarse a partir de una mezcla de reacción de una manera directa, por ejemplo, mediante filtración, centrifugación o decantación. Un gangliósido inmovilizado puede inmovilizarse de una manera reversible o irreversible. Por ejemplo, la inmovilización es reversible si la molécula interactúa con el transportador mediante interacciones iónicas que pueden enmascarse mediante la adición de una alta concentración de sal o si la molécula se une mediante un enlace covalente que puede cortarse. Por el contrario, la inmovilización es irreversible si la molécula se encuentra unida al transportador mediante un enlace covalente que no puede cortarse en solución acuosa. El gangliósido puede inmovilizarse indirectamente, por ejemplo, al inmovilizar un anticuerpo u otra entidad que tiene afinidad por el gangliósido, seguida de adición de la formación de gangliósido de un complejo a los efectos de que el complejo gangliósido-anticuerpo se inmovilice. La persona capacitada en el estado de la técnica está familiarizada con procedimientos para inmovilización de moléculas, tales como gangliosidos. Una manera a modo de ejemplo se describe por Chabraoui, F., Derrington, E. A., Mallie-Didier, F., Canfavreux, C., Quincy, C., y Caudie, C. (1993) *Dot-blot immunodetection of antibodies against GM1 and other gangliosides on PVDF-P membranes*, *J. Immun. Meth.* 165, 225-230.

Una tira de transferencia se usa de acuerdo con la invención. La persona capacitada en el estado de la técnica está familiarizada con la configuración experimental, que se describe en el estado de la técnica. En una realización preferida, el término “tira de transferencia”, según se usa en la presente, se refiere a una tira de prueba que se ha recubierto con una o más bandas de antígeno purificado, preferiblemente de, al menos, 80, 90, 95 o 99 % de pureza, antes del procedimiento de revestimiento. Si se usan uno o más antígenos, preferiblemente se encuentran separados espacialmente. Preferiblemente, el ancho de las bandas es de, al menos, el 30, más preferiblemente, 40, 50, 60, 70 u 80 % con respecto al ancho de la tira de prueba. La tira de prueba puede comprender una o más bandas de control para confirmar que se han contactado con muestra durante el tiempo suficiente y bajo condiciones suficientes, en especial suero humano, conjugado de anticuerpo, o ambos.

Cualquiera de los datos que demuestra la presencia o ausencia del complejo que comprende el anticuerpo y el polipéptido inventivo puede correlacionarse con datos de referencia. Por ejemplo, la detección de dicho complejo indica que el paciente que proporciona la muestra analizada ha sufrido, sufre o es propenso a sufrir en el futuro de una enfermedad. Si un paciente ha sido diagnosticado anteriormente y el procedimiento para obtener información diagnósticamente relevante se corre de nuevo, la cantidad de complejo que se detecta en ambos corrimientos puede correlacionarse para descubrir sobre el avance de la enfermedad y/o el éxito de un tratamiento. Por ejemplo, si se encuentra que la cantidad de complejo aumenta, esto sugiere que el desorden está avanzando, con probabilidad de manifestarse en el futuro y/o de que cualquier tratamiento que se intenta no tiene éxito.

La presente invención se ilustra, además, mediante las siguientes figuras y ejemplos no limitantes a partir de los que se pueden tomar características, realizaciones, aspectos y ventajas adicionales de la presente invención.

5 **Ejemplo:**

Ejemplos a partir de un grupo de 32 pacientes que sufren de una enfermedad neurológica que se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos para gangliósidos se someten a análisis usando el sistema ganglioside-profile 2 EUROLINE, EUROIMMUN, que se encuentra disponible comercialmente.

10 El sistema ganglioside-profile 2 EUROLINE, EUROIMMUN proporciona un ensayo *in vitro* cualitativo para la determinación de autoanticuerpos para gangliósido humano de clase IgG o IgM en el diagnóstico serológico de neuropatías periféricas inflamatorias. Al usar una combinación de diferentes antígenos purificados (GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GT1b y GQ1b) en una franja, autoanticuerpos para gangliósidos múltiples pueden investigarse de manera simultánea en una muestra. La tira de transferencia EUROIMMUN se designa para procesamiento a temperatura ambiente (TA).

15 El rendimiento de prueba en línea con las instrucciones del fabricante a TA (20 °C) se comparó con respecto al rendimiento a 4 °C bajo condiciones por lo demás idénticas. Las intensidades de banda se evaluaron usando el software EUROLINEScan.

20 Entre las 32 muestras, dos muestras obtenidas mediante plasmaféresis fueron identificadas como que contenían autoanticuerpos solo cuando el ensayo se corrió a 4 °C. No se detectó ningún autoanticuerpo para un gangliósido en una de estas muestras luego de incubación a TA.

25 Tres muestras se obtuvieron por aféresis, entre otras, una de las muestras discrepantes, que se caracterizaron luego usando el mismo ensayo en dos configuraciones experimentales en paralelo. De nuevo, se siguieron las instrucciones del fabricante, con excepción de que un tampón que comprendía 0,05 % de albúmina de suero bovino aislada se usó como el tampón de incubación en la segunda configuración experimental.

30 Resultó que los autoanticuerpos para gangliósidos podían detectarse cuando se usó el tampón que comprendía BSA antes que el tampón convencional. Las **Figs. 1A, 1B y 1C** muestran los datos primarios que se obtuvieron usando las tres muestras. En cada figura, el panel superior respectivo representa la tira de transferencia luego de incubación en tampón de incubación convencional según se proporciona por el fabricante, que no contenía una proteína de unión a gangliósido aislada. El panel inferior muestra la tira de transferencia luego de incubación en tampón que comprendía 0,05 % de BSA aislada. Las flechas de color negro marcan bandas visibles en cada tira de transferencia.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un uso de una albúmina aislada, o variante de la misma, que tiene actividad de unión a gangliósido para aumentar la sensibilidad de un ensayo para detectar un autoanticuerpo para un gangliósido en una muestra líquida que comprende anticuerpos con el fin de diagnosticar una enfermedad, en el que el uso comprende las etapas de
- 10 a) poner en contacto en una mezcla de reacción una muestra líquida que comprende anticuerpos de un sujeto con un gangliósido,
- b) detectar un complejo que comprende el gangliósido y un autoanticuerpo para el gangliósido,
- 15 en el que la etapa a) se lleva a cabo en la presencia de una proteína de unión a gangliósido aislada, que es una albúmina, o una variación de la misma, que tiene actividad de unión a gangliósido y en el que la etapa a) se realiza, en todo momento, a una temperatura de al menos 10 °C
- en el que se usa un dispositivo médico, que es una tira de transferencia.
- 20 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa a) comienza con el contacto inicial entre la muestra y el gangliósido y concluye con el retiro parcial o total de la muestra a partir de la mezcla de reacción.
3. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el gangliósido se selecciona del grupo que comprende GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GT1a, GT1b y GQ1b.
- 25 4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la albúmina es una albúmina de mamífero o una variante de esta, más preferiblemente, albúmina de suero bovino, o una variante de la misma.
- 30 5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la proteína de unión a gangliósido se presenta en una concentración del 0,001 al 5 %, más preferiblemente del 0,005 al 1 %, más preferiblemente, del 0,01 al 1 %.
6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el gangliósido se inmoviliza, preferiblemente en un dispositivo médico.
- 35 7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la muestra líquida se pone en contacto con o el dispositivo médico comprende, preferiblemente en una forma inmovilizada, dos o más, preferiblemente tres o más, preferiblemente, todos los gangliósidos del grupo que comprende GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GT1a, GT1b y GQ1b.
- 40 8. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el procedimiento es para el diagnóstico de una enfermedad neurológica, preferiblemente una neuropatía, más preferiblemente, que se selecciona del grupo que comprende GBS, CIPD, MMN y MFS.

Fig. 1A

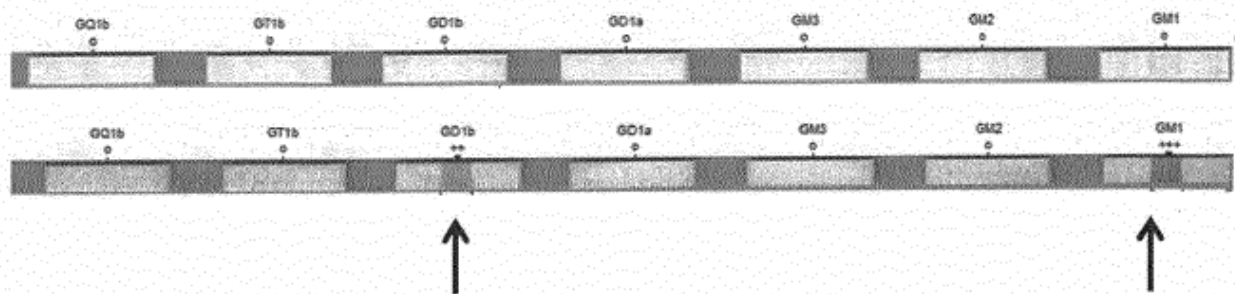


Fig. 1B

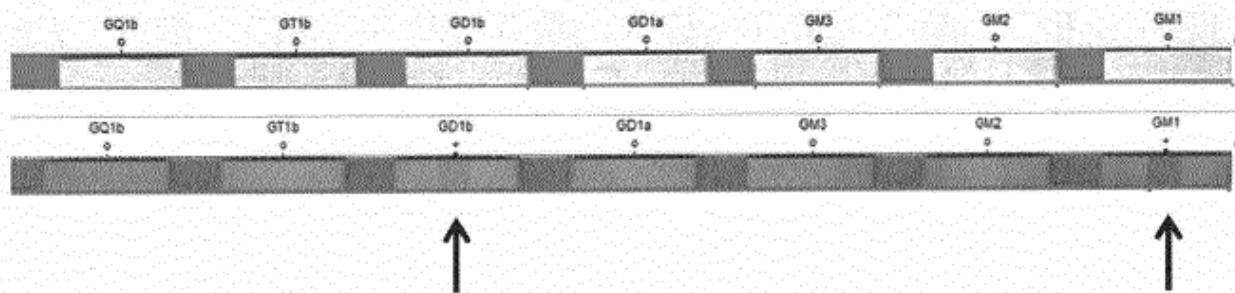


Fig. 1C

