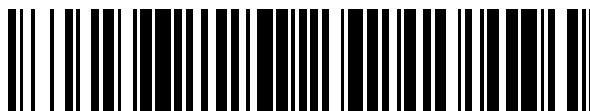


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 303**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.07.2015** **PCT/EP2015/066881**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2016** **WO16012542**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2015** **E 15742002 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020** **EP 3172567**

54 Título: **Procedimientos y kits de supervisión de la nefropatía membranosa**

30 Prioridad:

24.07.2014 EP 14306195

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

04.08.2020

73 Titular/es:

**UROIMMUN MEDIZINISCHE
LABORDIAGNOSTIKA AG (100.0%)
Seekamp 31
23560 Lübeck, DE**

72 Inventor/es:

**LAMBEAU, GÉRARD;
M. TOMAS, NICOLA;
SEITZ-POLSKI, BARBARA y
A.K. STAHL, ROLF**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 777 303 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

Procedimientos y kits de supervisión de la nefropatía membranosa

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un autoantígeno biomarcador que se reconoce específicamente por autoanticuerpos presentes en una muestra biológica de pacientes con nefropatía membranosa, particularmente nefropatía membranosa idiopática.

10 La invención proporciona procedimientos y kits para diagnosticar, pronosticar, supervisar y tratar la nefropatía membranosa, particularmente la nefropatía membranosa idiopática en un paciente.

Antecedentes de la invención

15 La nefropatía membranosa es una causa común del síndrome nefrótico. Alrededor del 15 % de los casos de nefropatía membranosa son nefropatía membranosa secundaria, causada por medicamentos, infecciones, tumores, enfermedades inmunes... El 85 % restante de los casos de nefropatía membranosa son idiopáticos, también llamados nefropatía membranosa primaria autoinmune. Su origen sigue siendo desconocido. Aproximadamente la mitad de los
20 pacientes con nefropatía membranosa idiopática que no recibieron tratamientos desarrollarán enfermedad renal en etapa terminal que requiere diálisis o trasplante renal. Entre los trasplantes de riñón, aproximadamente el 40 % de ellos recaerá.

25 El PLA2R1 se ha descrito como un autoantígeno principal en la nefropatía membranosa idiopática y puede usarse para el diagnóstico y la supervisión del tratamiento de la nefropatía membranosa idiopática tanto antes como después del injerto de riñón. También se han informado posibles estrategias terapéuticas basadas en este autoantígeno.

30 Sin embargo, solo aproximadamente el 70 % de los pacientes que sufren de nefropatía membranosa idiopática tienen autoanticuerpos anti-PLA2R1, lo que sugiere que otros autoantígenos y los autoanticuerpos correspondientes pueden estar involucrados en el 30 % restante de los casos. Por lo tanto, existe una necesidad correspondiente de diagnóstico, pronóstico y teragnosis para el 30 % de los pacientes que no pueden ser seguidos con base en el autoantígeno PLA2R1.

Sumario de la invención

35 La invención se refiere a la identificación de la proteína *7A que Contiene el Dominio de Trombospondina Tipo I* (THSD7A) como un nuevo autoantígeno en la nefropatía membranosa y un procedimiento *in vitro* correspondiente para diagnosticar y/o pronosticar la nefropatía membranosa, particularmente la nefropatía membranosa idiopática, en un paciente, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de detectar en una muestra biológica obtenida de dicho
40 paciente uno o más autoanticuerpos que reconocen la proteína THSD7A.

En una realización, dicho procedimiento *in vitro* comprende las etapas de:

45 (i) Poner en contacto una muestra biológica obtenida de dicho paciente con una proteína que incluye un polipéptido THSD7A o un fragmento de unión a anticuerpo del mismo, y
(ii) Detectar cualquier complejo antígeno-anticuerpo formado,

en el que la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo es indicativo de nefropatía membranosa.

50 Preferiblemente, la muestra biológica es una muestra de sangre.

La invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para evaluar la efectividad de un tratamiento para la nefropatía membranosa, particularmente la nefropatía membranosa idiopática, en un paciente, que comprende:

55 (i) determinar en un primer punto de tiempo un nivel de autoanticuerpos anti-THSD7A en dicha muestra obtenida de dicho paciente en dicho primer punto de tiempo,
(ii) determinar en un segundo punto de tiempo un nivel de autoanticuerpos anti-THSD7A en dicha muestra obtenida de dicho paciente en dicho segundo punto de tiempo, y
60 (iii) comparar los niveles de autoanticuerpos de los dos puntos de tiempo,

en el que:

- una disminución en el nivel de autoanticuerpos anti-THSD7A en el segundo punto de tiempo en comparación con el primer punto de tiempo indica que el tratamiento es efectivo y/o

- un aumento en el nivel de autoanticuerpos anti-THSD7A en el segundo punto de tiempo en comparación con el primer punto de tiempo indica que el tratamiento no es efectivo.

La presente invención proporciona además un kit para diagnosticar y/o pronosticar la nefropatía membranosa en un paciente, comprendiendo dicho kit:

- una proteína que incluye un polipéptido THSD7A o un fragmento de unión a anticuerpo del mismo, y
- un reactivo para la detección de un complejo antígeno-anticuerpo formado entre un autoantígeno y un autoanticuerpo presente en la muestra biológica, en el que el fragmento de THSD7A comprende al menos el 96 % de la secuencia completa de aminoácidos de THSD7A.

La invención también se refiere a un procedimiento *in vitro* para diagnosticar y/o pronosticar nefropatía membranosa, particularmente nefropatía membranosa idiopática, en un paciente, que comprende la etapa de determinar el nivel de THSD7A en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

En una realización, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas de:

- medir el nivel de proteína THSD7A en una muestra biológica obtenida de dicho paciente,
- comparar dicho nivel con un nivel de referencia,

en el que un mayor nivel de proteína THSD7A en comparación con dicho nivel de referencia es indicativo de una nefropatía membranosa.

Preferiblemente, la muestra biológica es una biopsia de riñón o una muestra de sangre.

Finalmente, la invención se refiere a procedimientos terapéuticos, composiciones farmacéuticas y usos para tratar la nefropatía membranosa.

De hecho, la invención se refiere a un procedimiento para tratar una nefropatía membranosa, particularmente una nefropatía membranosa idiopática en un paciente, comprendiendo el procedimiento eliminar autoanticuerpos anti-THSD7A de una muestra en dicho paciente *ex vivo*.

La invención también se refiere a un procedimiento para tratar una nefropatía membranosa, particularmente nefropatía membranosa idiopática en un paciente, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína que incluye un polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo, un vector que expresa dicho polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo o una célula huésped que expresa dicho polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo.

Además, la invención se refiere a una proteína que incluye un polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo (un vector que expresa dicho polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo o una célula huésped que expresa dicho polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo) para su uso en el tratamiento de nefropatía membranosa y una composición farmacéutica que comprende dicho polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo (un vector que expresa dicho polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo o una célula huésped que expresa dicho polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo), particularmente para el tratamiento de la nefropatía membranosa, más particularmente nefropatía membranosa idiopática.

Preferiblemente, para procedimientos terapéuticos, composiciones farmacéuticas y usos de la invención, el paciente es un paciente positivo para THSD7A.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Detección de autoanticuerpos contra un antígeno desconocido en pacientes con nefropatía membranosa. A. Resultados de la transferencia Western en un extracto glomerular humano (HGE) sondeado con sueros de pacientes con nefropatía membranosa (MN) y de pacientes de control. La mayoría de estos pacientes evaluados (88 %) fueron tomados de un banco de suero preexistente de Hamburgo, mientras que los sueros restantes eran de una cohorte de pacientes de Niza. Este panel muestra imágenes representativas de diferentes patrones de reactividad: tres de los sueros con MN representados (MN 2 hasta MN 4) reaccionaron con una proteína glomerular de aproximadamente 250 kDa de tamaño, pero no con el receptor de fosfolipasa A2 recombinante (rPLA2R1). Un suero con MN reconoció una proteína glomerular de alrededor de 180 kDa, así como el PLA2R1 recombinante (MN 36). No se observa reactividad para un suero con MN (MN 6), dos sueros de controles proteinúricos, uno con enfermedad de cambio mínimo (MCD) y uno con glomeruloesclerosis focal-segmentaria (FSGS), y un donante sano. **B.** De sesenta y nueve pacientes con nefropatía membranosa (MN) que fueron negativos para anticuerpos anti-PLA2R1, seis reaccionaron con un antígeno de 250 kDa. Cinco de estos seis tenían MN idiopática, mientras que uno tenía MN secundaria con anticuerpos antinucleares positivos (ANA). No se observó reactividad en pacientes positivos para anti-PLA2R1 (n = 60), pacientes con otras enfermedades glomerulares (n = 76) o controles sanos (n = 44).

Figura 2: Identificación del antígeno objetivo. A. Resultados de la transferencia Western de un extracto glomerular humano (HGE) y células HEK293 transfectadas que sobreexpresan el dominio de trombospondina tipo 1 que contiene 7A (rTHSD7A) con sueros reactivos y no reactivos. Este panel muestra imágenes representativas de tres pacientes con nefropatía membranosa (MN) cuyos sueros reaccionaron con HGE y rTHSD7A (MN 1 hasta MN 3), un paciente con MN no reactiva (MN 36), un paciente no reactivo con una enfermedad de cambio mínimo (MCD) y un paciente de control sano no reactivo. rTHSD7A migró a una posición ligeramente más baja que la proteína nativa contenida en el lisado glomerular, probablemente debido a una diferencia en la modificación postraduccional. **B.** Resultados de la inmunoprecipitación de THSD7A a partir de un lisado de un extracto glomerular humano (HGE). Los HGE se incubaron con muestras de suero reactivas y no reactivas de pacientes con MN y controles, seguido de la adición de matriz de afinidad de IgG4 humana. Las muestras se centrifugaron y los inmunoprecipitados se sometieron a electroforesis en condiciones reductoras, se transfirieron a membranas de PVDF y se detectaron con un anticuerpo policlonal anti-THSD7A de conejo. Los cinco sueros reactivos de pacientes con MN inmunoprecipitaron el antígeno objetivo de HGE (MN 1 hasta MN 5), mientras que un suero de MN no reactiva (MN 9) así como un suero de un paciente de control sano no lo hicieron. No se produjo inmunoprecipitación cuando el suero se reemplazó por agua en el experimento.

Figura 3: Relación entre los anticuerpos anti-THSD7A y el curso clínico de pacientes con MN. Resultados de la transferencia Western de volúmenes iguales de extracto glomerular humano (HGE) con muestras de suero seriales de un paciente con nefropatía membranosa. Después de una disminución inicial de la proteinuria, el paciente desarrolló edema severo y proteinuria intensa en septiembre de 2012. Se inició el tratamiento inmunosupresor con ciclosporina A y esteroides y la proteinuria disminuyó hasta que el paciente alcanzó la remisión parcial en enero de 2014. Este desarrollo de la actividad de la enfermedad se refleja en una disminución de la señal de la transferencia Western después del inicio del tratamiento inmunosupresor.

Figura 4: Arquitectura molecular de la gran proteína THSD7A (1657 aminoácidos). La proteína THSD7A consta de una gran parte extracelular que contiene un péptido señal, al menos diez repeticiones de trombospondina tipo 1 (varias de las cuales contienen secuencias ricas en triptófano) y un motivo RGD, un dominio transmembrana que comienza en el residuo de aminoácido 1608 y una cola intracelular corta.

Descripción detallada de la invención

Los inventores destacaron la presencia de autoanticuerpos en pacientes que sufren de nefropatía membranosa idiopática que son reactivos a un nuevo autoantígeno, la proteína *7A que Contiene el Dominio de Trombospondina Tipo I* (THSD7A).

Estos autoanticuerpos están presentes en sueros de aproximadamente el 15 % de los pacientes que sufren de nefropatía membranosa idiopática que no presentan autoanticuerpos anti-PLA2R1. Esto representa alrededor del 5-10 % de la población total de pacientes que sufren de nefropatía membranosa.

Los inventores mostraron que la mayoría de los autoanticuerpos anti-THSD7A encontrados en pacientes son de la subclase IgG4; también se encuentran las subclases IgG3, IgG2 e IgG1.

Definiciones

El término "nefropatía membranosa" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una enfermedad renal que es una causa frecuente de síndrome nefrótico en adultos. Abarca las nefropatías membranosas secundarias que son causadas por factores secundarios tales como el lupus eritematoso sistémico, la hepatitis B o la sífilis (...) y la nefropatía membranosa autoinmune primaria, también llamada "nefropatía membranosa idiopática". Se considera que la "nefropatía membranosa idiopática" es una enfermedad autoinmune dirigida a los glomérulos, el principal antígeno objetivo conocido que es el autoantígeno PLA2R1.

Todas las enfermedades, trastornos y síntomas descritos en el presente documento tienen el significado general aceptado en la técnica, como lo demuestran los libros de texto, en el momento de la presentación de la presente solicitud.

Como se usa en este documento, el término "indicativo de nefropatía membranosa", cuando se aplica a un proceso o evento, se refiere a un proceso o evento que es un diagnóstico de nefropatía membranosa, de modo que el proceso o evento se encuentra significativamente más a menudo en pacientes afectados con nefropatía membranosa que en sujetos sanos y/o en pacientes que padecen una enfermedad distinta de la nefropatía membranosa.

Los términos "biomarcador" y "marcador" se usan en el presente documento de manera intercambiable. Se refieren a una sustancia que es un indicador distintivo de un proceso biológico, evento biológico y/o condición patológica. De acuerdo con la invención, la proteína THSD7A (o un polipéptido THSD7A) y cualquier fragmento de unión a anticuerpos de la misma y los autoanticuerpos anti-THSD7A son biomarcadores de nefropatía membranosa, particularmente nefropatía membranosa idiopática.

Los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" se usan en el presente documento de manera intercambiable, y se refieren a secuencias de aminoácidos de una variedad de longitudes, ya sea en sus formas neutras (sin carga) o como

sales, y sin modificar o modificadas por glicosilación, oxidación de cadena lateral, fosforilación, citrulinación o transglutaminación. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos es una proteína nativa de longitud completa. En otras realizaciones, la secuencia de aminoácidos es un fragmento más pequeño de la proteína de longitud completa. En otras realizaciones más, la secuencia de aminoácidos se modifica mediante sustituyentes adicionales unidos a las cadenas laterales de aminoácidos, tales como marcadores de proteínas añadidas al terminal N o C, unidades de glicosilo, lípidos o iones inorgánicos tales como fosfatos, así como modificaciones relacionadas con la conversión química de las cadenas, tales como la oxidación de grupos sulfhidrilo. Por lo tanto, el término "proteína" (o sus términos equivalentes) pretende incluir la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa de longitud completa, o un fragmento de la misma, sujeta a aquellas modificaciones que no cambian significativamente sus propiedades específicas. En particular, el término "proteína" abarca isoformas de proteínas, es decir, variantes que están codificadas por el mismo gen, pero que difieren en su pl o PM, o en ambos. Dichas isoformas pueden diferir en su secuencia de aminoácidos (por ejemplo, como resultado de un empalme alternativo o una proteólisis limitada), o como alternativa, pueden surgir de una modificación postraducciona diferencial (por ejemplo, glicosilación, acilación, fosforilación).

El término THSD7A (*Proteína 7A que Contiene el Dominio de Trombospondina Tipo I*) tiene su significado general en la técnica y se refiere a una proteína de 1657 aminoácidos altamente expresada en podocitos e involucrada en la migración de células endoteliales y la formación de filopodios durante la angiogénesis a través de un mecanismo dependiente de FAK. El término puede incluir THSD7A natural y sus variantes y formas modificadas. THSD7A puede ser de cualquier fuente, pero típicamente es una THSD7A de mamífero (por ejemplo, primates humanos y no humanos u otras especies de mamíferos), particularmente una THSD7A humana. Se proporciona un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de THSD7A nativa humana en Q9UPZ6 (base de datos UniProt) y NP_056019 (base de datos GenPept, secuencia precursora) y se proporciona un ejemplo de una secuencia de ARNm de THSD7A nativa humana en NM_015204 (base de datos GenBank, secuencia precursora). La estructura de la proteína THSD7A se ilustra en la Figura 4.

Como se usa en el presente documento, la expresión "**fragmento de THSD7A**" se refiere a un elemento continuo de THSD7A. Típicamente, dicho fragmento es un fragmento biológicamente activo, es decir, comprende una o más propiedades funcionales de THSD7A.

En el contexto del péptido para su uso, un "fragmento" de THSD7A comprende, preferiblemente consiste en al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 92 %, al menos 94 %, al menos 96 %, al menos 98 %, al menos 99 % de la secuencia completa de aminoácidos de THSD7A.

Preferiblemente, dicho fragmento del péptido para uso comprende al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400, al menos 500, al menos 600, al menos 700, al menos 800, al menos 900, al menos 1000, al menos 1100, al menos 1120, al menos 1250, al menos 1300, al menos 1400, al menos 1500, al menos 1600, al menos 1620, al menos 1640 aminoácidos de la secuencia completa de aminoácidos de THSD7A.

El fragmento del kit y el fragmento del dispositivo de diagnóstico comprende al menos el 96 % de la secuencia completa de aminoácidos de THSD7A.

Preferiblemente, dicho fragmento es reconocido por un autoanticuerpo dirigido contra THSD7A. La determinación de la capacidad del fragmento para interactuar con dichos autoanticuerpos puede lograrse mediante uno de los procedimientos descritos anteriormente o conocidos en la técnica para determinar la unión directa.

El término PLA2R1 (*receptor de fosfolipasa A2 secretora*, también conocido como *PLA2R1*) tiene su significado general en la técnica y en el presente documento se refiere al receptor de fosfolipasa A2 de tipo M, un receptor codificado en humanos por el gen PLA2R1, particularmente conocido como antígeno principal en la nefropatía membranosa idiopática. Se proporciona un ejemplo de secuencia de aminoácidos de PLA2R1 nativa humana en NP_001007268 (base de datos GenPept) y se proporciona un ejemplo de secuencia de ARNm de THSD7A humana nativa en NM_001007267 (base de datos GenBank). Es de destacar que todas las referencias a las bases de datos, tal como códigos o números de acceso divulgados en el presente documento, se refieren a las versiones disponibles en línea el 24 de julio de 2014.

El término "paciente negativo para PLA2R1" o "paciente negativo para THSD7A" se refiere a un paciente cuyo suero no contiene autoanticuerpos (o al menos no autoanticuerpos detectables) dirigidos contra PLA2R1 o THSD7A, respectivamente. Por el contrario, "paciente positivo para PLA2R1" o "paciente positivo para THSD7A" se refiere a un paciente cuyo suero contiene autoanticuerpos dirigidos contra PLA2R1 o THSD7A respectivamente.

El término "autoanticuerpo" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un anticuerpo producido por el sistema inmunitario de un sujeto (o paciente) y que se dirige contra las proteínas propias del sujeto (o paciente) (por ejemplo, THSD7A). Los autoanticuerpos pueden atacar las propias células, tejidos y/u órganos del cuerpo, causando inflamación y daño celular. Los términos "autoanticuerpo que reconoce THSD7A" se pueden usar indistintamente con "autoanticuerpo anti-THSD7A".

El término "fragmento de unión a anticuerpo", cuando se usa en el presente documento en relación con un antígeno (por ejemplo, THSD7A), se refiere a un fragmento del antígeno que retiene la capacidad del antígeno de unirse a un anticuerpo para formar un complejo anticuerpo-antígeno. En particular, un fragmento de unión a anticuerpo de un antígeno de la presente invención retiene la capacidad de unirse a autoanticuerpos específicos de la nefropatía membranosa. Un experto en la técnica puede identificar fragmentos adecuados de unión a anticuerpos de un antígeno mediante ensayos simples para determinar su capacidad para unirse a autoanticuerpos específicos de nefropatía membranosa.

Como se usa en el presente documento, el término "paciente" se refiere a un sujeto humano u otro sujeto mamífero (por ejemplo, primate, perro, gato, cabra, caballo, cerdo, ratón, rata, conejo y similares), que puede estar afectado por una nefropatía membranosa, particularmente una nefropatía membranosa idiopática. Preferiblemente, el paciente es un paciente humano. Más preferiblemente, se sospecha que dicho paciente padece una nefropatía membranosa, particularmente una nefropatía membranosa idiopática.

El término "muestra biológica" se usa en el presente documento en su sentido más amplio. Generalmente se obtiene una muestra biológica para un sujeto. Dicho sujeto es mamífero, preferiblemente humano. Típicamente, la muestra biológica generalmente se obtiene de un paciente. Típicamente, dicha muestra comprende un conjunto representativo de autoanticuerpos.

Una muestra puede ser de cualquier tejido o fluido biológico con el que se puedan analizar el o los biomarcadores de la presente invención. Dichas muestras incluyen, entre otros, fluidos corporales que pueden contener o no células, por ejemplo, sangre (por ejemplo, sangre completa, suero o plasma). Dichas muestras también incluyen biopsias (por ejemplo, biopsia de riñón). El término muestra biológica también abarca cualquier material derivado del procesamiento de una muestra biológica. Los materiales derivados incluyen, entre otros, células (o su progenie) aisladas de la muestra o proteínas extraídas de la muestra. El procesamiento de una muestra biológica puede implicar uno o más de: filtración, destilación, extracción, concentración, inactivación de componentes interferentes, adición de reactivos y similares.

En el contexto de la presente invención, el término "control", cuando se usa para caracterizar a un sujeto, se refiere a un sujeto que está sano o a un paciente que ha sido diagnosticado con una enfermedad específica distinta de la enfermedad renal. El término "muestra de control" se refiere a una, o más de una muestra, que se ha obtenido de un sujeto sano o de un paciente diagnosticado con una enfermedad distinta del trastorno renal.

Los términos "normal" y "saludable" se usan en el presente documento de manera intercambiable. Se refieren a un sujeto que no ha mostrado ningún síntoma asociado con el trastorno renal y que no ha sido diagnosticado con nefropatía membranosa u otra nefropatía. Preferiblemente, un sujeto normal no está tomando medicamentos que afectan el sistema renal y no se le ha diagnosticado ninguna otra enfermedad. En ciertas realizaciones, los sujetos normales tienen sexo, edad y/o índice de masa corporal similares en comparación con el sujeto del que se obtuvo la muestra biológica a analizar. El término "normal" también se usa en el presente documento para calificar una muestra obtenida de un sujeto sano.

Como se usa en este documento, el término "nivel de referencia" se refiere a un nivel medido en una muestra biológica obtenida de un control o preferiblemente a un promedio de varios niveles medidos en muestras biológicas obtenidas de varios controles.

Como se usa en el presente documento, el término "diagnosis", "que se diagnostica" o "diagnóstico" se usa en su sentido más amplio y abarca diagnóstico, pronóstico, teragnosis y supervisión en la nefropatía membranosa.

Como se usa en el presente documento, el término "tratar" o tratamiento "se refiere a reducir o aliviar al menos un efecto adverso o síntoma asociado con condiciones médicas que están asociadas con nefropatía membranosa, particularmente nefropatía membranosa idiopática. Estas incluyen reducir la cantidad de autoanticuerpos anti-THSD7A, reducir, inhibir o detener la producción de autoanticuerpos anti-THSD7A, la supresión del sistema inmune y reducir la inflamación y la degradación/daño asociado con las actividades de los autoanticuerpos cuando están unidos a los glomérulos renales.

Como se usa en el presente documento, el término "teragnosis" se refiere a la identificación, por ejemplo mediante procedimientos de diagnóstico, de pacientes que podrían beneficiarse de una terapia particular.

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a esa cantidad de agente activo que puede reducir la cantidad de autoanticuerpos anti-THSD7A solubles. La reducción de la cantidad es al menos 10 %, particularmente al menos 20 %, más particularmente al menos 40 %, preferiblemente al menos 60 %, más preferiblemente al menos 80 %, incluso más preferiblemente al menos 95 %, de reducción en los autoanticuerpos en comparación con la cantidad de autoanticuerpos presentes en el suero antes del inicio de un tratamiento.

Como se usa en el presente documento, el término "composición farmacéutica" se refiere al agente activo de la invención (por ejemplo, un polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo, un vector que expresa dicho polipéptido

THSD7A o un fragmento del mismo, o una célula huésped que expresa dicho polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo, tal como se describe a continuación) en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable de productos químicos y compuestos comúnmente utilizados en la industria farmacéutica.

5 **Procedimientos y kits de diagnóstico y pronóstico basados en la detección de autoanticuerpos anti-THSD7A**

Procedimientos de diagnóstico

10 Por lo tanto, un primer objetivo de la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para diagnosticar y/o pronosticar nefropatía membranosa, más particularmente nefropatía membranosa idiopática, en un paciente, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de detectar en una muestra biológica obtenida de dicho paciente uno o más autoanticuerpos que reconocen la proteína THSD7A.

15 En una realización preferida, la muestra biológica es una muestra de sangre (que incluye sangre completa, suero o plasma). Preferiblemente, la muestra biológica es suero o plasma.

En una realización, el procedimiento *in vitro* para diagnosticar y/o pronosticar una nefropatía membranosa, particularmente una nefropatía membranosa idiopática, en un paciente, comprende las etapas de:

- 20 (i) Poner en contacto una muestra biológica obtenida de dicho paciente con una proteína que incluye un polipéptido THSD7A o un fragmento de unión a anticuerpo del mismo, y
- (ii) Detectar cualquier complejo antígeno-anticuerpo formado,

en el que la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo es indicativo de nefropatía membranosa.

25 En una realización de la invención, el polipéptido THSD7A o un fragmento de unión a anticuerpo del mismo puede ser de diferentes especies de mamíferos, particularmente humano, primate no humano, cerdo, conejo o ratón.

30 En una realización, el polipéptido THSD7A puede ser una proteína THSD7A completa.

En una realización de la invención, un fragmento de unión a anticuerpo puede comprender o consistir en el dominio extracelular completo de THSD7A o un fragmento del mismo constituido por uno o varios de sus distintos dominios de trombospondina tipo I y/o tallos de unión de THSD7A.

35 Los polipéptidos THSD7A y más generalmente todos los biomarcadores de la presente invención pueden prepararse por cualquier procedimiento adecuado, incluidos los procedimientos recombinantes. Tales procedimientos, como se describe, por ejemplo, en "The Proteins" (Vol. II, 3ª Edición, H. Neurath et al., (Editores), 1976, Academic Press: Nueva York, NY, páginas 105-237) también se pueden usar para sintetizar los biomarcadores de la invención.

40 En ciertas realizaciones, un biomarcador de polipéptido/proteína de la invención (por ejemplo, polipéptido THSD7A) se inmoviliza sobre un portador o soporte (por ejemplo, una perla o matriz). Por lo tanto, en esta realización, el procedimiento de la invención implica el uso de un dispositivo recubierto con la proteína que incluye un polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo. Típicamente, dicho dispositivo es un dispositivo médico o un dispositivo de diagnóstico, preferiblemente un dispositivo de diagnóstico.

45 Típicamente, en el contexto de la invención, la proteína que incluye un polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo se inmoviliza en dicho dispositivo.

50 Los procedimientos de diagnóstico de la presente invención implican la detección de un complejo antígeno-anticuerpo formado entre el biomarcador de la invención (por ejemplo, el polipéptido THSD7A) y un autoanticuerpo presente en la muestra biológica analizada. Esta detección es indicativa de la presencia de autoanticuerpos (a saber, autoanticuerpos anti-THSD7A) en dicha muestra.

55 En la práctica de la invención, la detección de dicho complejo puede realizarse por cualquier procedimiento adecuado (véase, por ejemplo, E. Harlow y A. Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", 1988, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, Nueva York).

60 Por ejemplo, la detección de un complejo antígeno-anticuerpo puede realizarse usando un inmunoensayo. Se encuentra disponible una amplia gama de técnicas de inmunoensayo, que incluyen radioinmunoensayo, inmunoensayos enzimáticos (EIA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), inmunoprecipitación de inmunofluorescencia y transferencia de línea. Los inmunoensayos son bien conocidos en la técnica y están dentro del conocimiento general de la persona experta en la técnica. Los procedimientos para llevar a cabo tales ensayos, así como las aplicaciones y procedimientos prácticos se resumen en los libros de texto. Ejemplos de tales libros de texto incluyen P. Tijssen, En: Practice and theory of enzyme immunoassays, eds. R.H. Burdon y v. P.H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam (1990), páginas 221-278 y diversos volúmenes de Methods in Enzymology, Eds. S.P. Colowick et al, Academic Press, que se refieren a los procedimientos de detección inmunológica, especialmente los volúmenes

70, 73, 74, 84, 92 y 121. Academic Press. Los inmunoensayos pueden ser competitivos o no competitivos. Por ejemplo, cualquiera de una serie de variaciones de la técnica del ensayo tipo sándwich se puede utilizar para realizar un inmunoensayo. Brevemente, en un ensayo tipo sándwich típico aplicado a la detección de autoanticuerpos anti-THSD7A de acuerdo con la presente invención, un polipéptido THSD7A (biomarcador) no marcado se inmoviliza en una superficie sólida (como se describió anteriormente) y la muestra biológica a analizar se pone en contacto con el biomarcador unido por un tiempo y bajo condiciones que permitan la formación de un complejo antígeno-anticuerpo. Preferiblemente, la formación del complejo antígeno-anticuerpo se realiza en condiciones no reductoras.

Después de la incubación, se agrega un anticuerpo que está marcado con una fracción detectable y que reconoce específicamente anticuerpos de las especies probadas (por ejemplo, una IgG antihumana para sujetos humanos) y se incuba en condiciones que permiten la formación de un complejo ternario entre cualquier autoanticuerpo unido a biomarcador y el anticuerpo marcado. Cualquier material no unido se elimina por lavado, y la presencia de cualquier autoanticuerpo anti-THSD7A en la muestra se determina mediante observación/detección de la señal producida directa o indirectamente por la fracción detectable. Las variaciones en este ensayo incluyen un ensayo, en el que tanto la muestra biológica como el anticuerpo marcado se agregan simultáneamente al biomarcador de proteína/polipéptido THSD7A inmovilizado.

El segundo anticuerpo (es decir, el anticuerpo agregado en un ensayo tipo sándwich como se describió anteriormente) puede marcarse con cualquier fracción detectable, es decir, cualquier entidad que, por su naturaleza química, proporcione una señal analíticamente identificable que permita la detección del complejo ternario y, en consecuencia, detección del complejo biomarcador-anticuerpo.

La detección puede ser cualitativa o cuantitativa. Los procedimientos para marcar moléculas biológicas tales como anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, "Affinity Techniques. Enzyme Purification: Parte B", Methods in Enzymol, 1974, Vol. 34, WB Jakoby y M. Wilneck (Editores), Academic Press: Nueva York, NY, y M. Wilchek y EA Bayer, Anal. Biochem., 1988, 171: 1-32). Las fracciones detectables más comúnmente utilizados en inmunoensayos son enzimas y fluoróforos. En el caso de un inmunoensayo enzimático (EIA o ELISA), una enzima tal como la peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, fosfatasa alcalina y similares, se conjuga con el segundo anticuerpo, generalmente mediante glutaraldehído o peryodato. Los sustratos que se utilizarán con las enzimas específicas se eligen generalmente para la producción de un cambio de color detectable, tras la hidrólisis de la enzima correspondiente. En el caso de la inmunofluorescencia, el segundo anticuerpo se acopla químicamente a una fracción fluorescente sin alterar su capacidad de unión. Después de la unión del anticuerpo marcado en forma fluorescente al complejo biomarcador-anticuerpo y la eliminación de cualquier material no unido, se detecta la señal fluorescente generada por la fracción fluorescente, y opcionalmente se cuantifica. Alternativamente, el segundo anticuerpo puede marcarse con un radioisótopo, una fracción quimioluminiscente o una fracción bioluminiscente.

Típicamente, en el contexto de la invención, el polipéptido THSD7A es un polipéptido aislado o un polipéptido recombinante.

Como se mencionó anteriormente, los biomarcadores de la invención son reconocidos específicamente por los sueros de una población de pacientes afectados por una nefropatía membranosa, más específicamente una nefropatía membranosa idiopática, y en particular por sueros de pacientes afectados por una nefropatía membranosa que no tienen autoanticuerpos anti-PLA2R1.

Por lo tanto, en una realización particular de la invención, dicho paciente es un paciente negativo para PLA2R.

El paciente también ha resultado negativo para todas las causas habituales de nefropatía membranosa, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, hepatitis B y sífilis.

Actualmente, no existe un procedimiento no invasivo disponible para el diagnóstico de nefropatía membranosa, particularmente nefropatía membranosa idiopática, para pacientes negativo para PLA2R1. Dichos pacientes tienen que someterse a una biopsia de riñón.

Por el contrario, el procedimiento de la invención es muy prometedor ya que podría exonerar de la necesidad de realizar técnicas invasivas, en pacientes negativo para THSD7A, así como en pacientes positivo para THSD7A.

En una realización particular, dicho paciente no se sometió y/o no se someterá a una biopsia de riñón.

Dicho procedimiento también se puede aplicar en paralelo al procedimiento de diagnóstico de nefropatía membranosa basado en la detección de autoanticuerpos anti-PLA2R1 (descritos en la solicitud de patente WO2010/009457) y se pueden evaluar biomarcadores adicionales de nefropatía membranosa, por ejemplo biomarcadores de nefropatías membranosas secundarias. Los ejemplos de tales biomarcadores incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos antinucleares (ANA), antígenos antihepatitis B y reaginas plasmáticas rápida (RPR).

Los resultados obtenidos usando dicho procedimiento de diagnóstico pueden compararse y/o combinarse con datos clínicos, resultados de otras pruebas, ensayos o procedimientos realizados para el diagnóstico de nefropatía membranosa. Tal comparación y/o combinación puede ayudar a proporcionar un diagnóstico más refinado.

5 Procedimientos de pronóstico y seguimiento del tratamiento de la nefropatía membranosa

Los inventores también mostraron una correlación entre la presencia y el nivel de autoanticuerpos anti-THS7A y la efectividad del tratamiento, remisión o recaída de pacientes con nefropatía membranosa, más específicamente nefropatía membranosa idiopática.

Los tratamientos actuales utilizados para la nefropatía membranosa, particularmente la nefropatía membranosa idiopática, son la terapia inmunosupresora, por ejemplo, ciclosporina, tacrolimus, azatioprina, infliximab, omalizumab, daclizumab, adalimumab, eculizumab, efalizumab, natalizumab, omalizumab y rapamicina. También incluye ciclofosfamida, clorambucilo y rituximab.

Por lo tanto, un objetivo adicional de la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para evaluar la efectividad de un tratamiento para la nefropatía membranosa, particularmente la nefropatía membranosa idiopática, en un paciente, que comprende:

- (i) determinar en un primer punto de tiempo un nivel de autoanticuerpos anti-THSD7A en dicha muestra obtenida de dicho paciente en dicho primer punto de tiempo,
- (ii) determinar en un segundo punto de tiempo un nivel de autoanticuerpos anti-THSD7A en dicha muestra obtenida de dicho paciente en dicho segundo punto de tiempo, y
- (iii) comparar los niveles de autoanticuerpos de los dos puntos de tiempo,

en el que:

- una disminución en el nivel de autoanticuerpos anti-THSD7A en el segundo punto de tiempo en comparación con el primer punto de tiempo indica que el tratamiento es efectivo, y/o
- un aumento en el nivel de autoanticuerpos anti-THSD7A en el segundo punto de tiempo en comparación con el primer punto de tiempo indica que el tratamiento no es efectivo.

El procedimiento de la invención se realiza preferiblemente para pacientes que han sido diagnosticados con nefropatía membranosa, particularmente nefropatía membranosa idiopática y que son pacientes positivos para THSD7A.

En la práctica de la invención, la determinación del nivel de autoanticuerpos anti-THSD7A puede realizarse por cualquier procedimiento cuantitativo adecuado, por ejemplo como se describió anteriormente (véase, por ejemplo, E. Harlow y A. Lane, "Antibodies: A Laboratories Manual", 1988, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY). En particular, el nivel de los autoanticuerpos anti-THSD7A puede detectarse mediante un inmunoensayo en el que se forma un complejo antígeno-anticuerpo.

Como se explicó anteriormente, el paciente ha sido diagnosticado inicialmente con nefropatía membranosa y tiene una cantidad detectable de autoanticuerpos anti-THSD7A. Tras el tratamiento, por ejemplo, con terapia inmunosupresora, con el tiempo, se observa una disminución en la cantidad de autoanticuerpos anti-THSD7A detectables en caso de tratamiento efectivo.

El tratamiento se considera efectivo cuando se observa una disminución de al menos 10 %, particularmente al menos 20 %, más particularmente al menos 30 %, incluso más particularmente al menos 40 %, preferiblemente al menos 50 %, más preferiblemente al menos 60 %, incluso más preferiblemente al menos 70 %, aún más preferiblemente al menos 80 %, del nivel de autoanticuerpos anti-THSD7A. Esto generalmente indica un buen pronóstico.

En un caso ideal, la cantidad de autoanticuerpos debería caer por debajo del nivel detectable de los procedimientos de detección descritos en este documento y se considera que el paciente está en remisión por el trastorno.

Por el contrario, el tratamiento se considera ineficaz cuando el nivel entre el primer y el segundo punto de tiempo es estable o aumenta al menos un 5 %, particularmente al menos un 10 %, más particularmente al menos un 20 %, incluso más particularmente al menos 30 %, aún más particularmente al menos 40 %, preferiblemente al menos 50 %, más preferiblemente al menos 60 %, incluso más preferiblemente al menos 70 %, aún más preferiblemente al menos 80 % o más del nivel inicial de autoanticuerpos anti-THSD7A.

Se pueden observar varias situaciones.

En una realización, no se detectan autoanticuerpos anti-THSD7A en el segundo punto de tiempo. Esto indica que se considera que el paciente está en remisión.

En otra realización, se observa un nivel estable de autoanticuerpos anti-THSD7A: los niveles obtenidos en el primer y el segundo puntos de tiempo son comparativamente similares dentro de las varianzas del análisis estadístico, con una desviación entre aproximadamente una desviación de 1-5 %, preferiblemente una desviación de 1-3 %. Esto indica una enfermedad estable en la que el tratamiento ha sido de duración insuficiente (por lo que debe continuarse si está clínicamente indicado) o no es efectivo.

En otra realización, se observa un mayor nivel de autoanticuerpos anti-THSD7A en el segundo punto de tiempo en comparación con el primer punto de tiempo y el primer punto de tiempo tenía autoanticuerpos anti-THSD7A detectables. Esto indica un empeoramiento de la enfermedad y/o falta de tratamiento eficiente. Se considera que un aumento de al menos 30 %, preferiblemente al menos 50 %, más preferiblemente al menos 100 %, incluso más preferiblemente al menos 200 % indica un empeoramiento de la situación y un mal pronóstico.

En otra realización, se observa un mayor nivel de autoanticuerpos anti-THSD7A en el segundo punto de tiempo en comparación con el primero y el primer punto de tiempo no tenía autoanticuerpos anti-THSD7A detectables. Esto indica que el paciente ha recaído y que la nefropatía membranosa ha recurrido.

De acuerdo con la invención, el segundo punto de tiempo se elige más tarde que el primer punto de tiempo. El primer y el segundo puntos de tiempo pueden elegirse estratégicamente, por ejemplo, con respecto a la estrategia terapéutica y para el seguimiento de un paciente que está en riesgo de desarrollar una nefropatía membranosa, particularmente una nefropatía membranosa idiopática, o que ya padeció una nefropatía membranosa, particularmente una nefropatía membranosa idiopática, y está en riesgo de recaída.

Por ejemplo, el primer punto de tiempo puede ser antes de la administración de cualquier tratamiento al paciente y el segundo punto de tiempo puede colocarse en un momento en que el tratamiento debe mostrar un efecto, o al final del tratamiento, y el ensayo puede ser repetido posteriormente.

El ensayo, por lo tanto, puede reproducirse varias veces; el nivel de autoanticuerpos anti-THSD7A puede evaluarse en más de dos puntos de tiempo. La comparación de la etapa (iii) debe hacerse con el primer punto de tiempo o con el punto de tiempo anterior. Una mejora de la salud del paciente y una efectividad del tratamiento están indicadas cuando se observa una disminución global del nivel de autoanticuerpos anti-THSD7A con el tiempo. Por el contrario, se indica una degradación de la salud del paciente y una ineficacia del tratamiento cuando no se observa una disminución del nivel de autoanticuerpos anti-THSD7A con el tiempo, particularmente cuando se observa un aumento global. La reaparición de autoanticuerpos anti-THSD7A detectables después de un período de autoanticuerpos anti-THSD7A no detectables es indicativo de una recaída.

El ensayo utilizado es idéntico para todas las muestras recogidas del paciente en los diferentes puntos de tiempo.

En un caso de tratamiento ineficaz, la estrategia terapéutica tiene que ser adaptada.

En vista de lo descrito anteriormente, el procedimiento *in vitro* para evaluar la efectividad de un tratamiento para la nefropatía membranosa, particularmente la nefropatía membranosa idiopática, en un paciente también constituye un procedimiento para pronosticar la nefropatía membranosa, particularmente la nefropatía membranosa idiopática, en un paciente.

Kits

En otro aspecto, la presente invención proporciona kits que comprenden materiales útiles para llevar a cabo procedimientos de acuerdo con la presente invención. Los procedimientos de diagnóstico proporcionados en este documento pueden ser realizados por laboratorios de diagnóstico, laboratorios experimentales o profesionales. La invención proporciona kits que se pueden usar en estos diferentes entornos.

Los materiales y reactivos para detectar autoanticuerpos THSD7A en una muestra biológica y/o para diagnosticar nefropatía membranosa en un paciente de acuerdo con la presente invención pueden ensamblarse juntos en un kit. Cada kit de la invención comprende al menos un biomarcador de proteína/polipéptido de la invención preferiblemente en una cantidad que es adecuada para la detección de autoanticuerpos en una muestra biológica.

Por lo tanto, un objetivo adicional de la invención se refiere a un kit para detectar autoanticuerpos que reconocen THSD7A en una muestra biológica obtenida de un paciente, comprendiendo dicho kit:

- una proteína que incluye un polipéptido THSD7A o un fragmento de unión a anticuerpo del mismo, y
- un reactivo para la detección de un complejo antígeno-anticuerpo formado entre un autoantígeno, preferiblemente un polipéptido THSD7A o un fragmento de unión a anticuerpo del mismo y un autoanticuerpo, en el que el fragmento de THSD7A comprende al menos el 96 % de la secuencia completa de aminoácidos de THSD7A, preferiblemente un autoanticuerpo dirigido contra THSD7A presente en la muestra biológica.

De acuerdo con la invención, el reactivo permite detectar un autoanticuerpo presente en dicha muestra biológica en la que el autoanticuerpo es un autoanticuerpo anti-THSD7A que es indicativo de nefropatía membranosa.

En el contexto de la invención, dicho polipéptido THSD7A es un polipéptido/proteína THSD7A de mamífero o un fragmento de unión a anticuerpo del mismo, preferiblemente un polipéptido/proteína THSD7A humano o un fragmento de unión a anticuerpo del mismo, que comprende o consiste particularmente en el dominio extracelular de THSD7A o un fragmento del mismo constituido por uno o varios de sus distintos dominios de trombospondina tipo I y/o tallos de enlace.

En una realización de la invención, la proteína que incluye un polipéptido THSD7A o un fragmento de unión a anticuerpo del mismo puede ser de diferentes especies de mamíferos, particularmente de primate humano, no humano, cerdo, conejo o ratón.

En una realización, la invención se refiere a un kit de la invención como se describió anteriormente para diagnosticar nefropatía membranosa en un paciente.

En una realización, dicho kit comprende además un polipéptido PLA2R1 o un fragmento de unión a anticuerpo del mismo.

En el contexto de la invención, dicho polipéptido PLA2R1 es un polipéptido/proteína PLA2R1 de mamífero y un fragmento de unión a anticuerpo del mismo, preferiblemente un polipéptido/proteína PLA2R1 humano y un fragmento de unión a anticuerpo del mismo.

En una realización de la invención, el polipéptido PLA2R1 o un fragmento de unión a anticuerpo del mismo puede ser de diferentes especies de mamíferos, particularmente de primate humano, no humano, cerdo, conejo o ratón.

El reactivo para la detección de un complejo antígeno-anticuerpo formado entre el marcador de autoantígeno y un autoanticuerpo presente en la muestra biológica, también permite detectar un autoanticuerpo anti-PLA2R1 que es indicativo de nefropatía membranosa (además del autoanticuerpo anti-THSD7A).

En otra realización, dicho kit puede comprender además al menos un biomarcador adicional de nefropatía membranosa, por ejemplo biomarcadores de nefropatías membranosas secundarias (tales como ANA, antígenos antihepatitis B, reagina plasmática rápida ...).

El o los biomarcadores de polipéptidos incluidos en un kit de la invención pueden o no inmovilizarse en la superficie del sustrato (por ejemplo, perlas, matriz y similares).

Por lo tanto, en un aspecto, la invención se refiere además a un dispositivo recubierto con la proteína que incluye un polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo. Típicamente, dicho dispositivo es un dispositivo médico o un dispositivo de diagnóstico, preferiblemente un dispositivo de diagnóstico.

Preferiblemente, dicho dispositivo se usa en un procedimiento para diagnosticar y/o pronosticar una nefropatía membranosa, particularmente nefropatía membranosa idiopática. Típicamente, en el contexto de la invención, la proteína que incluye un polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo se inmoviliza en dicho dispositivo.

Los procedimientos para inmovilizar moléculas de polipéptidos sobre una superficie sólida son conocidos en la técnica. Un polipéptido/proteína puede inmovilizarse uniéndose covalentemente o pasivamente a la superficie de un portador o soporte sólido. Los ejemplos de materiales de portadores o soporte adecuados incluyen, pero no se limitan a, agarosa, celulosa, nitrocelulosa, dextrano, Sefadex, Sefarosa, carboximetilcelulosa, poliácridamidas, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, papel de filtro, magnetita, resina de intercambio iónico, vidrio, copolímero de poliamina-metil-viniléter-ácido maleico, copolímero de aminoácidos, copolímero de etileno-ácido maleico, nailon, seda y similares. La inmovilización de un biomarcador de polipéptido/proteína en la superficie de un portador o soporte sólido puede implicar entrecruzamiento, unión covalente o adsorción física, usando procedimientos bien conocidos en la técnica. El portador o soporte sólido puede estar en forma de una perla, una partícula, un pocillo de microplaca, una matriz, una cubeta, un tubo, una membrana o cualquier otra forma adecuada para realizar un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con la invención (por ejemplo, usando un inmunoensayo).

Por lo tanto, en realizaciones preferidas, un kit de la invención incluye una matriz para diagnosticar nefropatía membranosa, particularmente nefropatía membranosa idiopática, como se proporciona en el presente documento. Alternativamente, se puede incluir una superficie de sustrato en un kit de la invención para la inmovilización de los biomarcadores de la invención.

Un kit de la invención también comprende al menos un reactivo para la detección de un complejo biomarcador-anticuerpo formado entre el biomarcador peptídico (por ejemplo, THSD7A y/o PLA2R) incluido en el kit y un autoanticuerpo presente en una muestra biológica. Dicho reactivo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo marcado que reconoce específicamente anticuerpos de las especies probadas (por ejemplo, una IgG antihumana, particularmente IgG4, IgG3, IgG2 e IgG1 preferiblemente IgG4, para sujetos humanos), como se describió anteriormente.

En una realización, dicho anticuerpo marcado reconoce todas las formas de IgG humana.

En otra realización, dicho anticuerpo marcado reconoce particularmente la subclase de IgG4 humana.

Dependiendo del procedimiento, el kit puede comprender además uno o más de los siguientes: tampón y/o reactivos de extracción, tampón y/o reactivos de bloqueo, tampón y/o reactivos de inmunodetección, tampón y/o reactivos de marcación, y medio de detección. Los protocolos para usar estos tampones y reactivos para realizar diferentes etapas del procedimiento pueden incluirse en el kit. Los diferentes reactivos incluidos en el kit de la invención pueden suministrarse en forma sólida (por ejemplo, liofilizada) o líquida. Los kits de la presente invención pueden comprender opcionalmente diferentes recipientes (por ejemplo, vial, ampolla, tubo de ensayo, matraz o botella) para cada tampón y/o reactivo individual. Cada componente generalmente será adecuado como alícuotas en su respectivo recipiente o provisto en forma concentrada. También se pueden proporcionar otros recipientes adecuados para realizar ciertas etapas de los procedimientos descritos. Los recipientes individuales del kit se mantienen preferiblemente en confinamiento cerrado para venta comercial.

En ciertas realizaciones, un kit comprende instrucciones para usar sus componentes para el diagnóstico de nefropatía membranosa, en particular nefropatía membranosa idiopática, en un paciente de acuerdo con un procedimiento de la invención. Las instrucciones para usar el kit de acuerdo con los procedimientos de la invención pueden comprender instrucciones para procesar la muestra biológica obtenida del paciente y/o para realizar la prueba, y/o instrucciones para interpretar los resultados. Un kit también puede contener una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos.

En una realización particular, la invención proporciona una matriz o matriz de proteínas para el diagnóstico de nefropatía membranosa, particularmente nefropatía membranosa idiopática, que comprende, inmovilizado en su superficie, al menos el biomarcador del polipéptido THSD7A de la invención. Preferiblemente, la matriz comprende más de un biomarcador de polipéptido/proteína de la invención y, por lo tanto, también comprende el biomarcador del polipéptido PLA2R1, adecuado para la detección de pacientes positivos para PLA2R. La matriz puede comprender además al menos un biomarcador adicional de nefropatía membranosa, por ejemplo, biomarcadores de nefropatías membranosas secundarias (tales como ANA, antígenos antihepatitis B, reagina plasmática rápida...).

En otra realización particular, la presente invención también proporciona una matriz de suspensión de perlas de proteínas para el diagnóstico de nefropatía membranosa, particularmente nefropatía membranosa idiopática. Esta matriz de suspensión de perlas comprende una suspensión de una o más partículas o perlas distintas identificables, en la que cada perla contiene características de codificación relacionadas con su tamaño, color o firma de fluorescencia y en la que cada perla está recubierta con un biomarcador de polipéptido/proteína de la presente invención.

Además en el presente documento se describe el uso de un kit, una matriz o una perla de la invención para diagnosticar nefropatía membranosa, en particular nefropatía membranosa idiopática, en un paciente.

En una realización, dicho kit, matriz o perla de la invención comprende

- un polipéptido THSD7A o un fragmento de unión a anticuerpo del mismo, y
- un reactivo para la detección de un complejo antígeno-anticuerpo formado entre el marcador de autoantígeno y un autoanticuerpo presente en la muestra biológica,

y puede usarse de acuerdo con los procedimientos de la invención.

Dicho kit, matriz o perla de la invención también puede usarse para evaluar la eficacia de un tratamiento para la nefropatía membranosa, particularmente la nefropatía membranosa idiopática, en un paciente y para pronosticar la nefropatía membranosa, particularmente la nefropatía membranosa idiopática, en un paciente.

En una realización particular, dicho paciente ha sido evaluado previamente para detectar la presencia de autoanticuerpos que reconocen PLA2R1 y es negativo para dichos autoanticuerpos. El paciente también ha resultado negativo para todas las causas habituales de nefropatía membranosa, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, hepatitis B y sífilis.

En ese caso, el kit o matriz de la invención usado para diagnosticar la nefropatía membranosa en dicho paciente no comprende ni el polipéptido PLA2R1 ni un fragmento de unión a anticuerpo del mismo ni ningún otro biomarcador de nefropatía membranosa.

Procedimientos y kits de diagnóstico basados en la detección del autoantígeno THSD7A

Los inventores mostraron que el autoantígeno THSD7A se sobreexpresa en el riñón de pacientes afectados por una nefropatía membranosa, particularmente con una nefropatía membranosa idiopática (particularmente en pacientes que tienen autoanticuerpos THSD7A).

Entonces, un objetivo adicional de la invención se refiere al uso de THSD7A como biomarcador de nefropatía membranosa, particularmente nefropatía membranosa idiopática.

La invención se refiere por lo tanto a un procedimiento *in vitro* para diagnosticar y/o pronosticar la nefropatía membranosa, particularmente la nefropatía membranosa idiopática en un paciente, que comprende la etapa de determinar el nivel de THSD7A en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

De acuerdo con la invención, dicho procedimiento *in vitro* para diagnosticar y/o pronosticar la nefropatía membranosa, particularmente la nefropatía membranosa idiopática en un paciente también abarca la supervisión de la nefropatía membranosa, particularmente la nefropatía membranosa idiopática en un paciente.

De acuerdo con la invención, el nivel de THSD7A abarca el nivel de proteína THSD7A y el nivel de proteína de ARNm.

En una realización particular, dicho paciente es un paciente negativo para PLA2R.

En una realización, dicho procedimiento también puede aplicarse en paralelo al procedimiento de diagnóstico de nefropatía membranosa basado en la detección de autoanticuerpos anti-PLA2R1 y biomarcadores adicionales de nefropatía membranosa.

En otra realización, dicha muestra biológica es preferiblemente una muestra de sangre o una biopsia de riñón.

Procedimiento de diagnóstico basado en la detección del nivel de proteína THSD7A

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para diagnosticar y/o pronosticar nefropatía membranosa, particularmente nefropatía membranosa idiopática en un paciente, que comprende la etapa de determinar el nivel de proteína THSD7A en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

En una realización particular, dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

- (i) Medir el nivel de proteína THSD7A en una muestra biológica obtenida de dicho paciente,
- (ii) Comparar dicho nivel con un nivel de referencia,

en el que un mayor nivel de proteína THSD7A en comparación con dicho nivel de referencia es indicativo de una nefropatía membranosa, particularmente una nefropatía membranosa idiopática.

Preferiblemente, la muestra biológica es una muestra de sangre o una biopsia de riñón.

Típicamente, un mayor nivel de proteína THSD7A corresponde a un aumento de al menos 20 %, preferiblemente al menos 50 % del nivel de proteína medido en una muestra de control.

El nivel de THSD7A puede medirse mediante diferentes procedimientos bien conocidos en la técnica.

En una realización particular, los procedimientos de la invención comprenden poner en contacto la muestra biológica con un compañero de unión capaz de interactuar selectivamente con los biomarcadores (por ejemplo, THSD7A) presentes en la muestra biológica.

El compañero de unión puede ser un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, preferiblemente monoclonal. En otra realización, el compañero de unión puede ser un aptámero.

Los anticuerpos policlonales de la invención o un fragmento de los mismos pueden generarse de acuerdo con procedimientos conocidos administrando el antígeno o epítipo apropiado a un animal huésped seleccionado, por ejemplo, de cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Se pueden usar varios adyuvantes conocidos en la técnica para mejorar la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos útiles en la práctica de la invención pueden ser policlonales, se prefieren los anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales de la invención o un fragmento de los mismos pueden prepararse y aislarse usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo. Las técnicas de producción y aislamiento incluyen, entre otras, la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975); la técnica de hibridoma de células B humanas (Cote et al., 1983); y la técnica de hibridoma de EBV (Cole et al., 1985).

Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla dirigidos contra los biomarcadores de la invención. Los anticuerpos útiles en la práctica de la presente invención también incluyen fragmentos de anti-biomarcadores que incluyen, pero no se limitan a, fragmentos F(ab')₂, que pueden generarse por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo intacta, y fragmentos Fab, que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, se pueden construir bibliotecas de expresión de Fab y/o scFv para permitir la identificación rápida de fragmentos que tienen la especificidad deseada

para los biomarcadores de la invención. Por ejemplo, se puede usar la presentación en fago de anticuerpos. En dicho procedimiento, los fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) o Fab se expresan en la superficie de un bacteriófago adecuado, por ejemplo, M13. Brevemente, las células del bazo de un huésped adecuado, por ejemplo, ratón, que ha sido inmunizado con una proteína se eliminan. Las regiones codificantes de las cadenas VL y VH se obtienen de aquellas células que producen el anticuerpo deseado contra la proteína. Estas regiones de codificación se fusionan a un terminal de una secuencia de fago. Una vez que el fago se inserta en un portador adecuado, por ejemplo, bacterias, el fago presenta el fragmento de anticuerpo. La presentación en fagos de anticuerpos también puede proporcionarse mediante procedimientos combinatorios conocidos por los expertos en la técnica. Los fragmentos de anticuerpos presentados por un fago se pueden usar como parte de un inmunoensayo. También se puede usar VHH.

Los ejemplos de anticuerpos monoclonales disponibles comercialmente que reconocen THSD7A incluyen los obtenidos a través de Abcam (ab121122), Novus Biologicals (NBP1-93612), Abnova Corporation (PAB20021), Atlas Antibodies (HPA000923) y Santa Cruz (sc-163453, sc-163455)

En otra realización, el compañero de unión puede ser un aptámero. Los aptámeros son una clase de moléculas que representan una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos u oligopéptidos con la capacidad de reconocer prácticamente cualquier clase de moléculas objetivo con alta afinidad y especificidad. Dichos ligandos pueden aislarse mediante la evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatorias, como se describe en Tuerk C. 1997. La biblioteca de secuencias aleatorias se puede obtener mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, de una secuencia única. Las posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas se han revisado en Jayasena SD, 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en regiones variables de anticuerpos constreñidas conformacionalmente presentados por una proteína de plataforma, tal como Tiorredoxina A de *E. coli*, que se seleccionan de bibliotecas combinatorias por dos procedimientos híbridos (Colas et al., 1996).

Los compañeros de unión de la invención, tales como anticuerpos o aptámeros, pueden marcarse con una molécula o sustancia detectable, tal como una molécula fluorescente, una molécula radiactiva o cualquier otro marcador conocido en la técnica. Los marcadores son conocidas en la técnica que generalmente proporcionan (ya sea directa o indirectamente) una señal.

Como se usa en el presente documento, el término "marcado", con respecto al anticuerpo, pretende abarcar el marcado directo del anticuerpo o del aptámero mediante el acoplamiento (es decir, el deslizamiento físico) de una sustancia detectable, tal como un agente radiactivo o un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o indocianina (Cy5)) al anticuerpo o aptámero, así como el marcado indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con una sustancia detectable. Un anticuerpo o aptámero de la invención puede marcarse con una molécula radiactiva por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, las moléculas radiactivas incluyen, pero no están limitadas a, átomos radiactivos para estudios escintigráficos tales como ^{123}I , ^{124}I , ^{111}In , ^{186}Re , ^{188}Re .

Los ensayos mencionados anteriormente pueden implicar la unión de un compañero de unión (es decir, anticuerpo o aptámero) a un soporte sólido. Los soportes sólidos que pueden usarse en la práctica de la invención incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (por ejemplo, en forma de membrana o pocillos de microtitulación); cloruro de polivinilo (por ejemplo, láminas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (por ejemplo, perlas o placas de microtitulación); fluoruro de polivinilideno; papel diazotado; membranas de nailon; perlas activadas, perlas magnéticamente sensibles y similares.

Los biomarcadores de la invención pueden detectarse usando técnicas de inmunodiagnóstico estándar, que incluyen inmunoensayos tales como ensayos de competición, reacción directa o tipo sándwich. Dichos ensayos incluyen, pero no se limitan a, pruebas de aglutinación; inmunoensayos marcados y mediados por enzimas, tales como ELISA; ensayos de tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; inmunoelectroforesis; inmunoprecipitación.

Más particularmente, se puede usar un procedimiento ELISA, en el que los pocillos de una placa de microtitulación están recubiertos con un conjunto de anticuerpos dirigidos contra biomarcadores de la invención. Luego se agrega una muestra biológica que contiene o se sospecha que contiene dicho biomarcador o biomarcadores a los pocillos recubiertos. Después de un período de incubación suficiente para permitir la formación de complejos de anticuerpo-antígeno, la placa o placas pueden lavarse para eliminar fracciones no unidas y añadirse una molécula de unión secundaria marcada de forma detectable. Se permite que la molécula de unión secundaria reaccione con cualquier proteína marcadora de muestra capturada, se lava la placa y se detecta la presencia de la molécula de unión secundaria usando procedimientos bien conocidos en la técnica.

Alternativamente, se puede usar un procedimiento de inmunohistoquímica (IHC). IHC proporciona específicamente un procedimiento para detectar objetivos en una muestra o espécimen de tejido *in situ*. La integridad celular general de la muestra se mantiene en IHC, lo que permite la detección tanto de la presencia como de la ubicación de los objetivos de interés. Típicamente, una muestra se fija con formalina, se incrusta en parafina y se corta en secciones para su tinción y posterior inspección por microscopía óptica. Los procedimientos actuales de IHC utilizan el marcado directo

o el marcado secundario basado en anticuerpos o haptenos. Los ejemplos de sistemas de IHC conocidos incluyen, por ejemplo, EnVision^{MR} (DakoCytomation), Powervision® (Immunovision, Springdale, AZ), el kit NBA^{MR} (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA), HistoFine® (Nichirei Corp, Tokio, Japón).

En una realización particular, una sección de tejido (es decir, una muestra de biopsia renal) puede montarse en un portaobjetos u otro soporte después de la incubación con anticuerpos que reconocen los biomarcadores de la invención (por ejemplo, anticuerpos anti-THSD7A). Luego, se pueden realizar inspecciones microscópicas en la muestra montada en un soporte sólido adecuado. Para la producción de fotomicrografías, las secciones que comprenden muestras pueden montarse en un portaobjetos de vidrio u otro soporte plano, para resaltar mediante tinción selectiva la presencia de biomarcadores de la invención (por ejemplo, proteína THSD7A).

Por lo tanto, las muestras de IHC pueden incluir, por ejemplo: (a) preparaciones que comprenden tejidos frescos o células aisladas de dichos tejidos, (b) fijadas e incrustadas dichas muestras de tejido o células y (c) detección de biomarcadores de la invención (por ejemplo, proteína THSD7A) en dichos tejidos o muestras de células. En algunas realizaciones, un procedimiento de tinción con IHC puede comprender etapas tales como: corte y recorte de tejido, fijación, deshidratación, infiltración de parafina, corte en secciones delgadas, montaje en portaobjetos de vidrio, cocción, desparafinación, rehidratación, recuperación de antígeno, etapas de bloqueo, aplicación anticuerpos primarios que reconoce los biomarcadores de la invención, lavado, aplicación de anticuerpo secundario (opcionalmente acoplado a un marcador detectable adecuado), lavado, contratinción y examen microscópico.

La detección del o los biomarcadores (con o sin procedimientos basados en inmunoensayo) también puede incluir la separación de los compuestos: centrifugación basada en el peso molecular del compuesto; electroforesis basada en masa y carga; HPLC basada en hidrofobicidad; cromatografía de exclusión por tamaño basada en el tamaño; y afinidad en fase sólida basada en la afinidad del compuesto por la fase sólida particular que se usa. Una vez separados, los biomarcadores de la invención pueden identificarse con base en el "perfil de separación" conocido por ejemplo, tiempo de retención, para ese compuesto y medido utilizando técnicas estándar.

Alternativamente, los compuestos separados se pueden detectar y medir mediante, por ejemplo, un espectrómetro de masas, especialmente cuando se miden fragmentos o péptidos de los biomarcadores.

En otro aspecto, como se describió anteriormente, la presente invención proporciona kits que comprenden materiales útiles para llevar a cabo procedimientos de acuerdo con la presente invención. Los procedimientos de diagnóstico proporcionados en este documento pueden ser realizados por laboratorios de diagnóstico, laboratorios experimentales o profesionales. La invención proporciona kits que se pueden usar en estos entornos diferentes.

Los materiales y reactivos para detectar el nivel de THSD7A (a nivel de ARNm o de proteína) en una muestra biológica y/o para diagnosticar nefropatía membranosa en un paciente de acuerdo con la presente invención pueden ensamblarse juntos en un kit.

En una realización, un kit de la invención comprende al menos un anticuerpo que reconoce THSD7A u otro compañero de unión de THSD7A.

En una realización particular, dicho kit puede comprender además al menos un anticuerpo que reconoce PLA2R1 u otro compañero de unión de PLA2R1.

En otra realización particular, dicho kit también puede comprender al menos otro anticuerpo (u otro compañero de unión) que reconoce otro biomarcador de nefropatía membranosa, por ejemplo biomarcadores de nefropatías membranosas secundarias (tales como ANA, antígenos antihepatitis B, reagina plasmática rápida...).

El compañero de unión se puede etiquetar para una detección más fácil. Puede o no estar inmovilizado en una superficie de sustrato (por ejemplo, perlas, matriz y similares). Por ejemplo, un kit de la invención puede incluir una matriz para diagnosticar nefropatía membranosa como se proporciona en el presente documento. Alternativamente, se puede incluir una superficie de sustrato (por ejemplo, membrana) en un kit de la invención para la inmovilización del compañero de unión (por ejemplo, mediante electroforesis y transferencia a membrana).

Además, un kit de la invención generalmente también comprende al menos un reactivo para la detección de un complejo entre un compañero de unión incluido en el kit y el biomarcador de la invención.

Dependiendo del procedimiento, el kit puede comprender además uno o más de: tampón y/o reactivos de extracción, tampón y/o reactivos de transferencia Western, y medios de detección. Los protocolos para usar estos tampones y reactivos para realizar diferentes etapas del procedimiento pueden incluirse en el kit.

Los diferentes reactivos incluidos en un kit de la invención pueden suministrarse en forma sólida (por ejemplo, liofilizada) o líquida. Los kits de la presente invención pueden comprender opcionalmente diferentes recipientes (por ejemplo, vial, ampolla, tubo de ensayo, matraz o botella) para cada tampón y/o reactivo individual. Cada componente generalmente será adecuado en forma de alícuotas en su recipiente respectivo o provisto en forma concentrada.

También se pueden proporcionar otros recipientes adecuados para realizar ciertas etapas de los procedimientos descritos. Los recipientes individuales del kit se mantienen preferiblemente en confinamiento cerrado para la venta comercial. En ciertas realizaciones, un kit comprende instrucciones para usar sus componentes para el diagnóstico, pronóstico o supervisión de la nefropatía membranosa en un paciente de acuerdo con un procedimiento de la invención. Las instrucciones para usar el kit de acuerdo con los procedimientos de la invención pueden comprender instrucciones para procesar la muestra biológica obtenida del sujeto y/o para realizar la prueba, o instrucciones para interpretar los resultados. Un kit también puede contener una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos.

Procedimiento de diagnóstico basado en la detección del nivel de ARNm de THSD7A

En otra realización, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para diagnosticar y/o pronosticar nefropatía membranosa, particularmente nefropatía membranosa idiopática en un paciente, que comprende la etapa de determinar el nivel de expresión de THSD7A en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

En una realización particular, dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

- (i) Medir el nivel de ARNm de THSD7A en una muestra biológica obtenida de dicho paciente,
- (ii) Comparar dicho nivel con un nivel de referencia,

en el que un mayor nivel de ARNm de THSD7A en comparación con dicho nivel de referencia es indicativo de una nefropatía membranosa, particularmente una nefropatía membranosa idiopática.

Preferiblemente, la muestra biológica es una muestra de sangre o una biopsia de riñón.

Típicamente, un mayor nivel de ARNm de THSD7A corresponde a un aumento de al menos 20 %, preferiblemente al menos 50 % del nivel de ARNm medido en una muestra de control.

Los procedimientos para determinar la cantidad de ARNm son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico contenido en las muestras (por ejemplo, células o tejidos preparados del paciente) se extrae primero de acuerdo con procedimientos estándar, por ejemplo usando enzimas líticas o soluciones químicas o extraído por resinas de unión a ácido nucleico siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNm extraído se detecta luego por hibridación (por ejemplo, análisis de transferencia Northern) y/o amplificación (por ejemplo, RT-PCR). En una realización preferida, el nivel de ARNm de THSD7A se determina mediante RT-PCR, preferiblemente RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa, incluso más preferiblemente RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa en tiempo real.

Otros procedimientos de amplificación incluyen reacción en cadena de ligasa (LCR), amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) y amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA).

Los ácidos nucleicos que tienen al menos 10 nucleótidos y exhiben complementariedad de secuencia u homología con el ARNm de interés en el presente documento encuentran utilidad como sondas de hibridación o cebadores de amplificación. Se entiende que tales ácidos nucleicos no necesitan ser idénticos, pero típicamente son al menos aproximadamente 80 % idénticos a la región homóloga de tamaño comparable, más preferiblemente 85 % idénticos e incluso más preferiblemente 90-95 % idénticos. En ciertas realizaciones, será ventajoso usar ácidos nucleicos en combinación con medios apropiados, tales como un marcador detectable, para detectar la hibridación. Se conoce una amplia variedad de indicadores apropiados en la técnica que incluyen ligandos fluorescentes, radiactivos, enzimáticos u otros (por ejemplo, avidina/biotina).

Las sondas comprenden típicamente ácidos nucleicos monocatenarios de entre 10 y 1000 nucleótidos de longitud, por ejemplo entre 10 y 800, más preferiblemente entre 15 y 700, típicamente entre 20 y 500. Los cebadores típicamente son ácidos nucleicos, de cadena sencilla más cortos de entre 10 y 25 nucleótidos de longitud, diseñados para coincidir perfectamente o casi perfectamente con un ácido nucleico de interés, para ser amplificado. Las sondas y los cebadores son "específicos" para los ácidos nucleicos con los que hibridan, es decir, preferiblemente hibridan en condiciones de hibridación de alta rigurosidad (correspondiente a la temperatura de fusión más alta T_m , por ejemplo, formamida al 50 %, SCC 5x o 6x. SCC es NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,015 M).

Los cebadores o sondas de ácido nucleico usados en el procedimiento de amplificación y detección anterior pueden ensamblarse como un kit. Tal kit incluye cebadores de consenso y sondas moleculares. Un kit preferido también incluye los componentes necesarios para determinar si se ha producido la amplificación. El kit también puede incluir, por ejemplo, tampones de PCR y enzimas; secuencias de control positivo, cebadores de control de reacción; e instrucciones para amplificar y detectar las secuencias específicas.

Procedimientos terapéuticos de la invención

Los inventores destacaron que la proteína THSD7A, que se expresa en los podocitos, es un autoantígeno en ciertos casos de nefropatía membranosa, lo que permite prever enfoques terapéuticos novedosos basados en el objetivo de este autoantígeno.

- 5 De hecho, como se describe en la técnica anterior, en particular para PLA2R1, los depósitos inmunes resultantes de la unión de autoanticuerpos a antígenos objetivo en el pie de podocitos pueden activar el sistema del complemento que conduce a la lesión de los podocitos.

- 10 Por lo tanto, un objetivo adicional de la invención se refiere a un procedimiento para tratar la nefropatía membranosa, particularmente la nefropatía membranosa idiopática, en un paciente, comprendiendo el procedimiento eliminar autoanticuerpos anti-THSD7A de una muestra en dicho paciente *ex vivo*.

En una realización, la nefropatía membranosa es una nefropatía membranosa idiopática.

- 15 En otra realización, el paciente es un paciente positivo para THSD7A.

Preferiblemente, el paciente es un paciente humano.

- 20 El anticuerpo puede eliminarse de la sangre mediante inmunoabsorción con un polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo como antígeno. La muestra se devuelve al paciente después de la eliminación de los anticuerpos.

- 25 La inmunoabsorción de autoanticuerpos contra THSD7A ayuda a reducir la cantidad de autoanticuerpos circulantes, particularmente autoanticuerpos THSD7A circulantes y, por lo tanto, reduce el daño potencial al riñón. Este tratamiento puede aplicarse inicialmente después de la confirmación inmunológica de la presencia de autoanticuerpos anti-THSD7A y antes del inicio de cualquier terapia inmunosupresora. Esto es especialmente útil durante este período temprano antes de que la terapia inmunosupresora pueda tener un efecto sobre el sistema inmune y la producción de autoanticuerpos en el paciente. Este tratamiento también se puede aplicar en cualquier momento durante el tratamiento y después del diagnóstico de dicho paciente como un paciente positivo para THSD7A.

- 30 En una realización, la inmunoabsorción de autoanticuerpos anti-THSD7A puede ocurrir haciendo pasar la sangre, suero o plasma sobre un polipéptido THSD7A inmovilizado. El THSD7A recombinante, preferiblemente THSD7A humano recombinante, o fragmentos pueden inmovilizarse en matrices inertes y estériles que se conocen en la técnica, tales como perlas de Sefarosa. Los autoanticuerpos anti-THSD7A se unirán al polipéptido THSD7A inmovilizado o fragmentos y recordarán que se unen indirectamente a la matriz. Luego se recoge la sangre, suero o plasma. Esta
35 sangre, suero o plasma resultante, debería tener autoanticuerpos anti-THSD7A reducidos o no detectables. El procedimiento de inmunoabsorción debe realizarse en condiciones estériles. La sangre, el suero o el plasma recolectados que se agotan de los autoanticuerpos anti-THSD7A se pueden transfundir nuevamente al paciente.

- 40 Como se usa en los procedimientos terapéuticos de la invención, un fragmento de polipéptido THSD7A es típicamente un fragmento de unión a anticuerpo.

- Otro objetivo adicional de la invención se refiere a un procedimiento para tratar una nefropatía membranosa, particularmente nefropatía membranosa idiopática, en un paciente, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína que incluye un polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo, un
45 vector que expresa dicho polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo o una célula huésped que expresa dicho polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo.

En una realización, la nefropatía membranosa es una nefropatía membranosa idiopática.

- 50 En otra realización, el paciente es un paciente positivo para THSD7A.

Preferiblemente, el paciente es un paciente humano.

- 55 De acuerdo con la invención, el polipéptido THSD7A o sus fragmentos se administran en forma soluble.

Al proporcionar el polipéptido THSD7A soluble o fragmentos del mismo, el polipéptido soluble puede funcionar como antígenos señuelo y secuestrar los autoanticuerpos lejos del THSD7A en los glomérulos renales, reduciendo así el daño potencial al riñón. El polipéptido THSD7A es preferiblemente un polipéptido THSD7A de origen humano.

- 60 En una realización, los fragmentos adecuados para el tratamiento o la adsorción de los autoanticuerpos a THSD7A del suero son fragmentos que comprenden o consisten en el dominio extracelular de THSD7A o un fragmento del mismo constituido por uno o varios de sus distintos dominios de trombospondina tipo I y/o tallos de enlazador.

- 65 Como se describió anteriormente, los polipéptidos THSD7A y sus fragmentos pueden sintetizarse mediante cualquier procedimiento bien conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, síntesis de proteínas recombinantes en células de bacterias, mamíferos, insectos, levaduras o plantas. Las técnicas convencionales de clonación por la reacción en

cadena de la polimerasa (PCR) se pueden utilizar para clonar un ácido nucleico que codifica un THSD7A, utilizando el ARNm del THSD7A como plantilla para la clonación por PCR. Como se describió anteriormente, se proporciona un ejemplo de secuencia de ARNm de THSD7A nativo humano en NM_015204 (GenBank).

5 Idealmente, los sitios de reconocimiento de la digestión con enzimas de restricción deberían diseñarse en los extremos de la cadena sentido y antisentido de los cebadores de PCR para facilitar la ligadura del ácido nucleico amplificado en un vector de clonación u otros vectores. Alternativamente, se puede incluir una saliente 3'-A con el propósito de clonar TA que es bien conocido en la técnica. Dichos ácidos nucleicos codificadores con salientes 3'-A se pueden ligar fácilmente en los vectores TA asistidos por topoisomerasa de Invitrogen tales como pCR®-TOPO, pCR®-Blunt II-TOPO, pENTR/D-TOPO® y pENTR/SD/D-TOPO®. El ácido nucleico codificante puede clonarse en un vector de clonación de uso general tal como pUC19, pBR322, vectores pBLUESCRIPT (STRATAGENE Inc.) o pCR TOPO® de INVITROGEN INC. El vector recombinante resultante que porta el ácido nucleico que codifica un THSD7A puede luego subclonarse en vectores de expresión de proteína o vectores virales para la síntesis de la proteína de fusión THSD7A en una variedad de sistemas de expresión de proteínas usando células huésped seleccionadas del grupo que consiste en líneas celulares de mamíferos, líneas celulares de insectos, levaduras, bacterias y células vegetales. Los sitios de escisión de proteasa también pueden diseñarse e incluirse dentro del ácido nucleico para facilitar la liberación de THSD7A de una proteína de fusión más grande, por ejemplo, His-THSD7A o tiorredoxina-THSD7A. Los ejemplos de sitios de escisión de proteasas incluyen, entre otros, los de enteroquinasa, quimotripsina y trombina.

20 Los ácidos nucleicos codificantes amplificados por PCR pueden clonarse en un vector usando el procedimiento de clonación TOPO® en vectores TA asistidos por topoisomerasa de INVITROGEN tales como pCR®-TOPO, pCR®-Blunt II-TOPO, pENTR/D-TOPO®, y pENTR/SD/D-TOPO®. Tanto pENTR/D-TOPO® como pENTR/SD/D-TOPO® son vectores de entrada de TOPO direccionales que permiten la clonación de la secuencia de ADN en la orientación 5' -> 3' en un vector de expresión GATEWAY®. La clonación direccional en la orientación 5' -> 3' facilita la inserción unidireccional de la secuencia de ADN en un vector de expresión de proteínas de manera que el promotor esté secuencia arriba del codón de inicio 5'-ATG del ácido nucleico, permitiendo así la expresión de proteínas impulsadas por el promotor. El vector recombinante que porta un ácido nucleico que codifica THSD7A se puede transfectar y propagar en células de *E. coli* de clonación general tales como células XLBlue, SURE (STRATAGENE) y TOP-10 (INVITROGEN).

30 Están disponibles diferentes vectores de expresión para la expresión y la purificación de una proteína recombinante producida a partir de un sistema de expresión de proteína heteróloga. Sistemas de expresión de proteínas heterólogas que usan células huésped seleccionadas de, por ejemplo, las células de mamíferos, insectos, levaduras, bacterias o plantas son bien conocidas por un experto en la materia. El vector de expresión debe tener los elementos reguladores 5' secuencia arriba y 3' secuencia abajo necesarios, tales como secuencias promotoras, caja TATA de reconocimiento y unión de ribosomas, y secuencia de terminación de transcripción UTR AAUAAA-3' para una transcripción y traducción eficiente de genes en su célula huésped respectiva. El vector de expresión puede tener una secuencia adicional tal como 6X-histidina, V5, tiorredoxina, glutatión-S-transferasa, c-Myc, VSV-G, HSV, FLAG, péptido de unión a maltosa, péptido de unión a metal, HA y señales de "secreción" (melitina de abeja, factor α , PHO, Bip), que se incorporan a la proteína recombinante expresada. Además, puede haber sitios de digestión enzimática incorporados después de estas secuencias para facilitar la eliminación enzimática de secuencias adicionales después de que no sean necesarias. Estas secuencias adicionales son útiles para la detección de la expresión de proteínas recombinantes, para la purificación de proteínas por cromatografía de afinidad, solubilidad mejorada de la proteína recombinante en el citoplasma del huésped, para una mejor expresión de proteínas especialmente para pequeños fragmentos de proteínas y/o para secretar la proteína recombinante expresada fuera del medio de cultivo, en el periplasma de las bacterias procariotas o en el esferoplasto de las células de levadura. La expresión de la proteína recombinante puede ser constitutiva en las células huésped o puede inducirse, por ejemplo, con sulfato de cobre, azúcares como galactosa, metanol, metilamina, tiamina, tetraciclina, infección con baculovirus e (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido) IPTG, un análogo sintético estable de la lactosa.

50 En algunas realizaciones, el THSD7A recombinante puede expresarse en una variedad de células huésped de expresión, por ejemplo, bacterias, tales como *E. coli*, células de levadura, mamíferos, insectos y plantas tales como *Chlamydomonas*, o incluso de sistemas de expresión libres de células. A partir de un vector de clonación, el ácido nucleico puede subclonarse en un vector de expresión recombinante que sea apropiado para la expresión de la proteína en células de mamíferos, insectos, levaduras, bacterias o plantas o un sistema de expresión libre de células, tal como un sistema de expresión de reticulocitos de conejo. La subclonación se puede lograr mediante clonación por PCR, digestión de restricción seguida de ligadura o reacción de recombinación como las de la recombinación específica de sitio basada en fagos lambda usando las mezclas de enzimas Gateway® LR y BP CLONASE^{MR}. La subclonación debe ser unidireccional de modo que el codón de inicio 5'-ATG del ácido nucleico esté secuencia abajo del promotor en el vector de expresión. Alternativamente, cuando el ácido nucleico codificante se clona en pENTR/D-TOPO®, pENTR/SD/D-TOPO® (vectores de entrada direccional), o cualquiera de los vectores pENTR (entrada) de GATEWAY® Technology de Invitrogen, el ácido nucleico codificante puede transferirse a los diversos vectores de expresión GATEWAY® (destino) para la expresión de proteínas en células de mamífero, *E. coli*, insectos y levaduras respectivamente en una única reacción de recombinación. Algunos de los vectores de destino GATEWAY® están diseñados para las construcciones de baculovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), retrovirus y lentivirus, que al infectar sus respectivas células huésped, permiten la expresión heteróloga de la proteína recombinante en las

células huésped. La transferencia de un gen a un vector de destino se realiza en solo dos etapas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Existen vectores de expresión GATEWAY® para la expresión de proteínas en *E. coli*, células de insecto, células de mamífero y levadura. Después de la transformación y selección en *E. coli*, el vector de expresión está listo para usarse para la expresión en el huésped apropiado.

Ejemplos de otros vectores de expresión y células huésped son los vectores pET (NOVAGEN), los vectores pGEX (Amersham Pharmacia) y los vectores pMAL (New England Labs. Inc.) para la expresión de proteínas en células huésped de *E. coli* tales como BL21, BL21(DE3) y AD494(DE3) pLysS, Rosetta(DE3) y Origami(DE3) (NOVAGEN); los vectores fuertes pcDNA3.1 (INVITROGEN) y pCIneo (Promega) basados en el promotor de CMV para la expresión en líneas celulares de mamíferos tales como CHO, COS, HEK-293, Jurkat y MCF-7; vectores del vector adenoviral incompetentes de replicación pADENO X, pAd5F35, pLP-ADENO-X-CMV (CLONTECH), pAd/CMV/V5-DEST, vector pAd-DEST (INVITROGEN) para la transferencia y expresión génica mediada por adenovirus en células de mamífero; vectores de retrovirus pLNCX2, pLXSN y pLAPSN para usar con el sistema RETRO-X^{MR} de Clontech para la transferencia y expresión génica mediada por retrovirus en células de mamífero; pLenti4/V5-DEST^{MR}, pLenti6/V5-DEST^{MR} y pLenti6.2/V5-GW/lacZ (INVITROGEN) para la transferencia y expresión génica mediada por lentivirus en células de mamífero; vectores de expresión de virus asociados a adenovirus tales como pAAV-MCS, pAAV-IRES-hrGFP y el vector pAAV-RC (STRATAGENE) para la transferencia y expresión génica mediada por virus adenoasociados en células de mamífero; baculovirus BACpak6 (CLONTECH) y pFASTBAC^{MR} HT (INVITROGEN) para la expresión en líneas celulares de insectos *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) y Sfll; pMT/BiP/V5-His (INVITROGEN) para la expresión en células *Drosophila Schneider* S2; vectores de expresión de *Pichia* pPICZα, pPICZ, pFLDα y pFLD (INVITROGEN) para expresión en *Pichia pastoris* y vectores pMETα y pMET para expresión en *P. methanolica*; Vectores pYES2/GS y pYDI (INVITROGEN) para la expresión en levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Los recientes avances en la expresión a gran escala de proteínas heterólogas en *Chlamydomonas reinhardtii* son descritos por Griesbeck C. et. al. 2006 Mol. Biotechnol. 34:213-33 y Fuhrmann M. 2004, Methods Mol Med. 94:191-5. Las secuencias de codificación heterólogas foráneas se insertan en el genoma del núcleo, cloroplasto y mitocondrias por recombinación homóloga. El vector de expresión de cloroplasto p64 que porta el versátil marcador seleccionable de cloroplasto aminoglicósido adenil transferasa (aadA), que confiere resistencia a la espectinomomicina o estreptomomicina, puede usarse para expresar proteínas foráneas en el cloroplasto. El procedimiento de pistola de genes biolística se puede utilizar para introducir el vector en las algas. Tras su entrada en los cloroplastos, el ADN foráneo se libera de las partículas de la pistola de genes y se integra en el genoma del cloroplasto mediante recombinación homóloga.

La expresión de proteínas recombinantes en las diferentes células huésped puede ser constitutiva o inducible con inductores tales como sulfato de cobre, azúcares tales como galactosa, metanol, metilamina, tiamina, tetraciclina o IPTG. Después de que la proteína se expresa en las células huésped, las células huésped se lisan para liberar la proteína expresada para la purificación. Los procedimientos para lisar las diversas células huésped se presentan en "Sample Preparation-Tools for Protein Research" EMD Bioscience y en los Current Protocols in Protein Sciences (CPPS). Un procedimiento de purificación preferido es cromatografía de afinidad, tal como cromatografía de afinidad ión-metal usando resinas de afinidad de níquel, cobalto o zinc para la proteína recombinante etiquetada con histidina. CLONTECH describe los procedimientos para purificar proteínas recombinantes marcadas con histidina utilizando su resina de cobalto TALON® y NOVAGEN en su manual del sistema pET, 10ª edición. Otra estrategia de purificación preferida es mediante cromatografía de inmunoafinidad, por ejemplo, se puede usar resina conjugada con anticuerpo anti-myc para purificar por afinidad el péptido recombinante marcado con myc. La digestión enzimática con serina proteasas como la trombina y la enteroquinasa se escinden y liberan la proteína recombinante de la etiqueta de histidina o myc, liberando la proteína recombinante de la resina de afinidad, mientras que las etiquetas de histidina y las etiquetas de myc quedan unidas a la resina de afinidad.

También se contemplan sistemas de expresión libres de células. Los sistemas de expresión sin células ofrecen varias ventajas sobre los procedimientos tradicionales de expresión basados en células, incluida la fácil modificación de las condiciones de reacción para favorecer el plegamiento de proteínas, la disminución de la sensibilidad a la toxicidad del producto y la idoneidad para estrategias de alto rendimiento tal como el cribado de expresión rápida o la producción de proteínas en grandes cantidades debido a la reducción de los volúmenes de reacción y el tiempo del proceso. El sistema de expresión libre de células puede usar ADN plasmídico o lineal. Además, las mejoras en la eficiencia de la traducción han dado como resultado rendimientos que exceden un miligramo de proteína por mililitro de mezcla de reacción. Se describe un ejemplo de un sistema de traducción libre de células capaz de producir proteínas con alto rendimiento por Spirin AS. et. al., Science 242: 1162 (1988). El procedimiento utiliza un diseño de flujo continuo del tampón de alimentación que contiene aminoácidos, trifosfato de adenosina (ATP) y trifosfato de guanosina (GTP) en toda la mezcla de reacción y una eliminación continua del producto polipeptídico traducido. El sistema utiliza lisado de *E. coli* para proporcionar el tampón de alimentación continuo libre de células. Este sistema de flujo continuo es compatible con los vectores de expresión procariotas y eucariotas. Como ejemplo, se describe la producción a gran escala sin células del transportador multifármaco EmrE de la proteína de membrana integral por Chang G. et al., Science 310: 1950-3 (2005).

Otros sistemas de expresión sin células disponibles comercialmente incluyen los sistemas de expresión sin células EXPRESSWAY^{MR} (Invitrogen) que utilizan un sistema *in vitro* basado en *E. coli* para reacciones eficientes de transcripción y traducción acopladas para producir cantidades de hasta miligramos de proteína recombinante activa en un formato de reacción en tubo; el sistema de traducción rápida (RTS) (Roche Applied Science) que también utiliza

un sistema *in vitro* basado en *E. coli*; y los sistemas de lisado de reticulocitos acoplados a TNT (Promega) que utilizan un sistema *in vitro* basado en reticulocitos de conejo.

5 En una realización, se usa un cóctel de varios polipéptidos THSD7A para el tratamiento. Los péptidos previstos se pueden fusionar con otras proteínas para una vida media en suero más prolongada, péptidos unidos en tándem o péptidos circulares.

10 En los procedimientos descritos en este documento se incluye un THSD7A de mamífero que se purifica de un mamífero, por ejemplo, un cerdo o un conejo. En una realización, el THSD7A de mamífero nativo (no recombinante) se purifica a partir de los riñones *ex vivo*. Los procedimientos de purificación de proteínas nativas son bien conocidos por el experto en la materia.

15 Otro objeto adicional de la invención se refiere a una proteína que incluye un polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo para usar en el tratamiento de la nefropatía membranosa, particularmente la nefropatía membranosa idiopática.

En una realización, la nefropatía membranosa es una nefropatía membranosa idiopática.

En otra realización, el paciente es un paciente positivo para THSD7A.

20 Preferiblemente, el paciente es un paciente humano.

En una realización preferida, dicho fragmento del polipéptido THSD7A es un fragmento de unión a anticuerpos (lo que significa de acuerdo con la invención que los autoanticuerpos de pacientes afectados con una nefropatía membranosa idiopática reconocen dicho fragmento).

25 Preferiblemente, dicho fragmento de THSD7A comprende o consiste en el dominio extracelular de THSD7A o un fragmento del mismo constituido por uno o varios de sus distintos dominios de trombospondina tipo I y/o tallos enlazadores.

30 De acuerdo con la invención, dicho polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo se usa en una cantidad terapéuticamente eficaz.

35 En una realización particular, la invención también proporciona un vector que expresa dicho polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo o una célula huésped que expresa dicho polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo.

Se describe adicionalmente en el presente documento una composición farmacéutica que comprende un polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. También se describe en el presente documento dicha composición farmacéutica para su uso para tratar la nefropatía membranosa.

40 La nefropatía membranosa puede ser una nefropatía membranosa idiopática.

El paciente puede ser un paciente positivo para THSD7A.

45 El paciente puede ser un paciente humano.

Dicha composición farmacéutica puede comprender un vector que expresa dicho polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo o una célula huésped que expresa dicho polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo.

50 La composición farmacéutica puede ser una combinación de THSD7A de longitud completa y fragmentos de varios tamaños, particularmente fragmentos de unión a anticuerpos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de tales fragmentos abarcan, pero no se limitan a, fragmentos que comprenden o consisten en el dominio extracelular de THSD7A o un fragmento del mismo constituido por uno o varios de sus distintos dominios de trombospondina tipo I y/o tallos enlazadores.

55 La composición farmacéutica de la invención puede comprender un cóctel de varios polipéptidos THSD7A o fragmentos de los mismos. Los péptidos previstos pueden fusionarse con otras proteínas para una semivida en suero más prolongada, péptidos unidos en tándem o péptidos circulares.

60 El término "farmacéuticamente aceptable" puede significar aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de petróleo, origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables.

Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes reguladores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Gennaro, ed. (Mack Publishing Co., 1990). En una realización, se pueden agregar otros ingredientes a formulaciones farmacéuticas, que incluyen antioxidantes, por ejemplo, ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente diez residuos), por ejemplo, poliarginina o tripéptidos; proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico o arginina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen celulosa o sus derivados, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; y alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol.

La composición puede formularse de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaina para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. En general, los ingredientes se suministran por separado o se mezclan en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente herméticamente cerrado, tal como una ampolla o una bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua o solución salina estéril de grado farmacéutico. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

Las composiciones pueden formularse como formas neutras o de sal.

Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y los formados con cationes tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, por nombrar algunos.

Se conocen varios sistemas de administración en la técnica y pueden usarse para administrar un polipéptido THSD7A o fragmentos del mismo, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas y microcápsulas (véase, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem., 262: 4429-4432 (1987)). La composición puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase, Langer, Science, 249: 1527-1533 (1990); Treat et al., en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler, eds. (Liss, New York 1989), páginas 353-365; Lopez-Berestein, ibídem, páginas 317-327; véase, en general, ibídem). Los procedimientos de introducción incluyen, entre otros, vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Las composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir las composiciones farmacéuticas en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, incluida la inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular se puede facilitar mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito Omcan. La administración pulmonar también se puede emplear, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente aerosolizante.

La formulación farmacéutica que se usa para la administración terapéutica debe ser estéril. La esterilidad se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles (por ejemplo, membranas de 0,2 micras). El pH de la formulación farmacéutica típicamente debería ser de aproximadamente 6 a 8.

La composición puede administrarse en un sistema de liberación controlada. Se puede usar una bomba (véase Langer, citado anteriormente; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng., 14: 201 (1987); Buchwald et al., Surgery, 88: 507 (1980); Saudek et al., N Engl. J. Med., 321: 574 (1989)). Se pueden usar materiales poliméricos (véase, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise, editores (CRC Press, Boca Raton, Florida, 1974); Controlled Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball, editores (Wiley, Nueva York 1984); Ranger y Peppas, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem., 23: 61 (1983); véase también Levy et al., Science, 228: 190 (1985); During et al., Ann Neurol., 25:35 1 (1989); Howard et al., J. Neurosurg., 7 1: 105 (1989)). Otros sistemas de liberación controlada son discutidos en la revisión de Langer (Science, 249: 1527-1533 (1990)). Para ejemplos de composiciones de liberación sostenida, véase la patente de los Estados Unidos No. 3.773.919, el documento EP 58.481A, la patente de Estados Unidos No. 3.887.699, el documento EP 158.277A, la patente canadiense No. 1176565, U. Sidman et al., Biopolymers 22: 547 (1983) y R. Langer et al., Chem. Tech. 12:98 (1982).

La dosis precisa que se empleará en la formulación también dependerá de la vía de administración, y la gravedad de la nefropatía membranosa y el título de autoanticuerpos anti-THSD7A en el suero, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del profesional y las circunstancias de cada paciente. Las dosis efectivas se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o de modelos animales.

5 La dosis administrada a un paciente es típicamente de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferiblemente, la dosis administrada a un paciente está entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg del peso corporal del paciente, más preferiblemente 1 mg/kg a 10 mg/kg del peso corporal del paciente. Para la terapia génica, el vector viral debe estar en el intervalo de 1×10^6 a 10^{14} partículas de vectores virales por aplicación por paciente.

10 Además, los ensayos *in vitro* o *in vivo* pueden emplearse opcionalmente para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que se empleará también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la afección que se esté tratando, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del profesional y las circunstancias de cada sujeto en vista de, por ejemplo, estudios clínicos publicados. Sin embargo, las cantidades de dosificación eficaces adecuadas varían de aproximadamente 10 microgramos a aproximadamente 5 gramos aproximadamente cada 4 horas, aunque típicamente son de aproximadamente 500 mg o menos por cada 4 horas. En una realización, la dosis efectiva es de aproximadamente 10 µg, aproximadamente 20 µg, aproximadamente 50 µg, aproximadamente 100 µg, aproximadamente 200 µg, aproximadamente 300 µg, aproximadamente 400 µg, aproximadamente 500 µg, aproximadamente 600 µg, aproximadamente 700 µg, aproximadamente 800 µg, aproximadamente 900 µg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 1,2 mg, aproximadamente 1,4 mg, aproximadamente 1,6 mg, aproximadamente 1,8 mg, aproximadamente 2,0 mg, aproximadamente 2,2 mg, aproximadamente 2,4 mg, aproximadamente 2,6 mg, aproximadamente 2,8 mg, aproximadamente 3,0 mg, aproximadamente 3,2 mg, aproximadamente 3,4 mg, aproximadamente 3,6 mg, aproximadamente 3,8 mg, aproximadamente 4,0 mg, aproximadamente 4,2 mg, aproximadamente 4,4 mg, aproximadamente 4,6 mg, aproximadamente 4,8 mg o aproximadamente 5,0 mg, 10,0 mg, 15,0 mg, 20,0 mg, 25,0 mg, 50,0 mg cada 4 horas. Las dosis equivalentes se pueden administrar durante varios períodos de tiempo, que incluyen, entre otros, aproximadamente cada 2 horas, aproximadamente cada 6 horas, aproximadamente cada 8 horas, aproximadamente cada 12 horas, aproximadamente cada 24 horas, aproximadamente cada 36 horas, aproximadamente cada 48 horas, aproximadamente cada 72 horas, aproximadamente cada semana, aproximadamente cada dos semanas, aproximadamente cada tres semanas, aproximadamente cada mes y aproximadamente cada dos meses. Las cantidades de dosificación efectivas descritas en este documento se refieren a cantidades totales administradas. El polipéptido THSD7A, sus fragmentos o los vectores de expresión y/o las células huésped que lo comprenden para su uso se administran adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

35 En una realización, la composición que comprende una proteína que incluye un polipéptido THSD7A o fragmentos del mismo para su uso se administra en combinación con terapias inmunosupresoras que incluyen, pero no se limitan a, azatioprina, infliximab, omalizumab, daclizumab, adalimumab, eculizumab, efalizumab, natalizumab, omalizumab, ciclofosfamida, clorambucilo y/o rituximab.

40 En particular, la composición que comprende una proteína que incluye un polipéptido THSD7A o fragmentos del mismo para su uso se administra en combinación con cualquier tratamiento útil para tratar la nefropatía membranosa, particularmente la nefropatía membranosa idiopática, y que podría ser eficaz para el paciente.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

45 Ejemplos

Material y procedimientos

50 **Pacientes.** El diagnóstico de nefropatía membranosa (MN) se realizó mediante biopsia renal. Se tomaron sueros de pacientes con nefropatía membranosa, pacientes con otras enfermedades renales y controles sanos. Todos los pacientes no tenían terapia inmunosupresora previa en el momento en que se tomó el primer suero. Los sueros fueron investigados para anticuerpos anti-PLA2R1 por medio de ELISA.

55 **Tejido renal humano.** Se utilizaron partes sanas de los riñones de pacientes sometidos a nefrectomía para la preparación de un extracto de glomérulos humanos. Los glomérulos se obtuvieron por tamizado graduado y se homogeneizaron con el homogeneizador de Dounce. Las fracciones solubles y de membrana se separaron por ultracentrifugación y solubilización. Para eliminar la presente inmunoglobulina G, las muestras se incubaron con microperlas de proteína G (Milenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania) y las inmunoglobulinas unidas se extrajeron mediante columnas de separación magnética (del mismo modo). Para la desglicosilación enzimática, los inventores usaron N-glicopeptidasa F y Neuraminidasa de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ambas de Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

65 **Análisis de transferencia Western.** Las muestras de proteínas se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no reductoras o reductoras y se transfirieron a membranas de PVDF en condiciones semisecas (BioRad, Hercules, EE. UU.). Las membranas (Millipore, Billerica, EE. UU.) se bloquearon con leche en

polvo al 5 % en PBS-Tween al 0,05 % durante la noche y posteriormente se incubaron con anticuerpos primarios y secundarios durante 2 horas a temperatura ambiente. Para su uso como anticuerpo primario, los sueros se diluyeron a una dilución de trabajo 1:100 en leche en polvo al 0,5 %. Para la detección específica de THSD7A (proteína A que contiene el dominio de Trombospondina tipo 1), los inventores usaron un anticuerpo policlonal de conejo disponible comercialmente (Sigma, St. Louis, EE. UU.) a una dilución de trabajo de 1:1.000. Los anticuerpos secundarios fueron IgG anti-humano de ratón o anti-conejo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (todos de Southern Biotech, Birmingham, EE. UU.). Cuando se deseaba la detección de la subclase de IgG, se aplicaron IgG1-IgG4 antihumana de ratón (de la misma manera).

Inmunoprecipitación. Los lisados glomerulares humanos se incubaron con sueros de pacientes con nefropatía membranosa u otras enfermedades glomerulares, y de controles sanos. Se añadió la matriz de afinidad de IgG4 (Life Technologies, Leiden, Países Bajos) y las muestras se incubaron durante la noche a 4 °C. Los inmunoprecipitados se recogieron por centrifugación a baja velocidad y las muestras se sometieron a electroforesis, se transfirieron y se detectaron con anticuerpo anti-THSD7A como se describió anteriormente.

Espectrometría de masas. Las regiones de gel correspondientes a las bandas visibles en el análisis de transferencia Western se cortaron y se sometieron a digestión triptica en gel. Los péptidos digeridos se aislaron usando ácido fórmico y acetonitrilo, se separaron por medio de nano cromatografía líquida de alta resolución (nanoHPLC), y se identificaron por espectrometría de masa en tándem de desorción láser/tiempo de vuelo de ionización asistida por matriz (MALDI-TOF) usando un espectrómetro de masas ABI 4700 (AB Sciex, Framingham, EE. UU.). Los datos sin procesar fueron analizados por el software ProteinPilot (AB Sciex, Framingham, EE. UU.) y se procesaron adicionalmente utilizando el algoritmo Paragon.

Expresión recombinante de proteínas candidatas. Los ADNc humanos que codifican THSD7A y los tres parálogos de PLA2R1, es decir, el receptor de manosa de macrófagos (MRC1), el receptor endocítico 180 (MRC2) y el receptor de células dendríticas 205 (LY75), fueron clonados por PCR utilizando procedimientos estándar o adquiridos a través de compañías (Gene Coppel y OriGene). Todas las secuencias de ADNc se verificaron mediante secuenciación después de la subclonación en vectores de expresión de mamíferos y la adición de etiquetas específicas de HA o DDK (pLPCX o pCMV6 de entrada). Los plásmidos se transfectaron transitoriamente en células HEK293 mediante transfección con fosfato de calcio. Después de 72 horas, se recogió el medio y las células se rasparon y se lisaron. La fracción soluble de la proteína de interés expresada se obtuvo por ultracentrifugación. La fracción de membrana se resuspendió en tampón de lisis, se homogeneizó por medio de un vigoroso proceso manual y la fracción solubilizada se obtuvo después de una centrifugación a alta velocidad. La expresión de las proteínas candidatas se verificó mediante análisis de transferencia Western usando anticuerpos específicos y se comparó con la transfección simulada.

Análisis histológico. Para los análisis de inmunofluorescencia, las secciones de parafina 2 µm del polo sano de una muestra de nefrectomía tumoral humana se desparafinizaron y se rehidrataron en agua. La recuperación del antígeno se obtuvo hirviendo en de tampón citrato pH 6,1 (30 min a 98 °C constante). La unión inespecífica se bloqueó con suero de caballo al 5 % (Vector, Burlingame, EE. UU.) con Triton X-100 al 0,05 % (SIGMA, St. Louis, EE. UU.) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la incubación a 4 °C o/y con anticuerpos primarios en tampón de bloqueo. La tinción se visualizó con anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromo (Jackson ImmunoResearch, Dianova, Hamburgo, Alemania; 1:400, 30 min a temperatura ambiente en suero de caballo al 5 %). Los núcleos se visualizaron utilizando DRAQ5 (Molecular Probes, LIFE TECHNOLOGIES, Grand Island, EE. UU.). Los controles negativos se realizaron omitiendo anticuerpos primarios. Las secciones teñidas se evaluaron mediante microscopía confocal utilizando el Microscopio de barrido láser 510 y el software apropiado (ALL ZEISS, OBERKÖCHEN, Alemania).

Para la inmunohistoquímica, se desparafinaron y rehidrataron secciones de parafina de 1 µm de biopsias renales de pacientes con MN. La recuperación de antígeno se obtuvo hirviendo en tampón de recuperación de antígeno DAKO, pH 9 (15 min a 98 °C) y posterior enfriamiento a temperatura ambiente durante 15 min. La unión inespecífica se bloqueó con suero de caballo al 5 % (Vector) con Triton X-100 al 0,05 % (SIGMA) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la incubación a 4 °C o/y con anti-THSD7A de conejo (1:400, Atlas) en tampón de bloqueo. La tinción se visualizó con el kit ZytocemPlus AP Polymer (ZYTOMED SYSTEMS) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los núcleos se contratiñeron con hemalaun y las secciones se montaron con goma arábica (SIGMA). Los controles negativos se realizaron omitiendo anticuerpos primarios. Las tinciones se evaluaron con un Axioskop utilizando el software Axiovision (ALL ZEISS).

Los anticuerpos primarios utilizados para los análisis histológicos fueron: anti-THSD7A y anti-PLA2R1 de conejo (ATLAS, 1:200), antinefrina de cobaya (ACRIS, 1:100), anti-colágeno de cabra tipo IV (SOUTHERNBIOTECH, 1: 400) y anti-fibronectina de oveja (DAKO, 1:500). Todos los anticuerpos secundarios eran anticuerpos de burro purificados por afinidad conjugados con fluorocromo (JACKSON IMMUNORESEARCH, Dianova, Hamburgo, Alemania, 1: 400).

Resultados

Cribado de sueros de nefropatía membranosa idiopática con los parálogos de PLA2R1 y un lisado de proteínas de glomérulos humanos. Se cribaron sueros de nefropatía membranosa idiopática (IMN) y sueros de control relevantes mediante dos enfoques paralelos. El primero se centró en los parálogos de PLA2R1 como antígenos

candidatos. El segundo fue más general, cribando los sueros en proteínas totales de un extracto glomerular humano (HGE).

Las tres proteínas parálogas de PLA2R1, es decir, el receptor de manosa de macrófagos (MRC1), el receptor endocítico 180 (MRC2) y el receptor de células dendríticas 205 (LY75) se expresaron transitoriamente como proteínas recombinantes en células HEK293. La reactividad del suero contra estos parálogos, así como HGE, se investigó mediante análisis de transferencia Western en condiciones no reductoras con suero de 65 pacientes con nefropatía membranosa (de los cuales 30 fueron negativos para anticuerpos anti-PLA2R1), 57 pacientes con otras enfermedades renales proteinúricas y 44 controles sanos. Todos los sueros que se sabía que eran positivos para anticuerpos anti-PLA2R1, de acuerdo con lo probado previamente por ELISA, reaccionaron con PLA2R1 recombinante en el análisis de transferencia Western, pero ninguno de estos sueros ni sueros de otras categorías reaccionaron con las proteínas parálogas de PLA2R1. Los sueros de 4 pacientes con iMN, todos negativos para anticuerpos anti-PLA2R1, reconocieron la misma proteína glomerular de aproximadamente 250 kDa de tamaño (Figura 1A). Los sueros de pacientes con otras enfermedades renales o de controles sanos no mostraron ninguna reactividad en esta área. El cribado se extendió a 129 pacientes con nefropatía membranosa (95 con iMN y 34 con MN secundaria). Se encontró que un total de 6 sueros, todos negativos para anticuerpos anti-PLA2R1 en ELISA y análisis de transferencia Western, reaccionaron con la misma proteína de 250 kDa (Figura 1B). Entre estos pacientes, 5 tenían iMN y 1 tenía MN con un título positivo para anticuerpos antinucleares (ANA), clasificando a este paciente como un caso de MN secundaria (Figura 1B).

El cribado anterior identificó así un nuevo autoantígeno de 250 kDa presente en HGE, probablemente distinto del PLA2R1 que tiene un tamaño de aproximadamente 180 kDa en la misma preparación de HGE. Para discriminar mejor entre los dos antígenos, se procesaron las proteínas HGE en geles SDS-PAGE con bajo porcentaje de acrilamida para separar las dos proteínas de interés, luego se prepararon transferencias Western e se incubaron secuencialmente las membranas con sueros reactivos contra PLA2R1 o el nuevo antígeno. Como se esperaba, se revelaron dos bandas distintas con una diferencia de tamaño de aproximadamente 60 kDa, lo que indica la presencia de dos antígenos diferentes. Para caracterizar aún más el nuevo antígeno en comparación con PLA2R1, se desglicosiló enzimáticamente HGE que contenía los dos antígenos. La N-glicopeptidasa F disminuyó el tamaño del nuevo antígeno a aproximadamente 225 kDa, y la adición de Neuraminidasa, una enzima que elimina el ácido siálico, causó un cambio adicional a 200 kDa. Por otro lado, PLA2R1 migró a aproximadamente 145 kDa después de la adición de N-glicopeptidasa F, como se describió anteriormente, pero no se observó más cambio después de la adición de Neuraminidasa. Todos los sueros que reaccionan con la proteína de 250 kDa totalmente glicosilada también reconocieron las formas desglicosiladas en la misma masa molecular, lo que sugiere que todos los sueros reconocen la misma proteína. Además, tanto el nuevo antígeno como PLA2R1 están presentes en la fracción de la membrana de HGE, pero solo PLA2R1 está presente en la fracción soluble.

Identificación del nuevo antígeno HGE como THSD7A. Se realizó electroforesis en gel de proteínas glomerulares nativas y proteínas glomerulares tratadas con N-glicopeptidasa F, así como con N-glicopeptidasa F y Neuraminidasa. La mayor parte de las proteínas de cada tratamiento se tiñó con colorante azul de Coomassie y la otra parte se transfirió a PVDF y se sondeó con suero de un paciente positivo para anticuerpos contra el nuevo antígeno. Luego se cortaron las áreas de gel teñidas con Coomassie correspondientes a las señales de transferencia Western a 250 kDa, 225 kDa y 200 kDa como se describió anteriormente, suponiendo que la proteína objetivo estaría específicamente presente en las tres condiciones. El análisis espectrométrico de masas se realizó en todas las rebanadas de gel y se obtuvo una lista primaria de candidatos. Las proteínas candidatas se clasificaron de acuerdo con las características bioquímicas esperadas del nuevo antígeno, es decir, por referencia a su masa molecular, N-glicosilación, localización membranosa y expresión en riñones o glomérulos humanos. Curiosamente, todos los parálogos previamente probados de PLA2R1 aparecieron en el análisis de espectrometría de masas en una posición prominente, justificando retrospectivamente el enfoque inicial. Se utilizaron anticuerpos disponibles comercialmente y células HEK293 transfectadas transitoriamente para analizar específicamente los antígenos candidatos y eventualmente se identificó el *proteína 7A que contiene el dominio de trombospondina tipo 1* (THSD7A) como la proteína de interés.

De hecho, todos los 6 sueros que reaccionaron previamente con la proteína de 250 kDa en HGE, pero ninguno de los sueros o controles positivos anti-PLA2R1, también reconocieron THSD7A recombinante expresado en células HEK293 (Figura 2A). Es de destacar que la proteína THSD7A nativa presente en HGE y la proteína recombinante expresada en las células HEK293 mostraron el mismo patrón de glicosilación, sin embargo, la proteína recombinante migró a una posición ligeramente inferior, lo que sugiere una diferencia menor en la modificación postraduccional (Figura 2A). Como prueba final de que el autoantígeno glomerular reconocido por los sueros reactivos era de hecho THSD7A, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación. Todos los sueros reactivos, pero no los controles, inmunoprecipitaron THSD7A a partir de HGE, como lo demuestra la reactividad de los precipitados con un anticuerpo policlonal específico contra THSD7A (Figura 2B).

Caracterización de autoanticuerpos anti-THSD7A. Para determinar el o los subtipos de IgG de autoanticuerpos anti-THSD7A, se utilizaron anticuerpos secundarios contra las diferentes IgG (1 a 4). Se descubrió que la IgG4 anti-THSD7A era el anticuerpo predominante para los 6 sueros reactivos. Sin embargo, otros subtipos de IgG también estaban presentes en la mayoría de los sueros. Este hallazgo estuvo de acuerdo con la tinción mejorada para IgG4 en todas las biopsias disponibles. Además, todos los sueros positivos perdieron su reactividad tanto a la proteína de

250 kDa en HGE como a THSD7A recombinante cuando los geles se procesaron en condiciones reductoras. Por lo tanto, en cuanto a los autoanticuerpos anti-PLA2R1, los autoanticuerpos anti-THSD7A son principalmente IgG4 y reconocen uno o más epítopos dependientes de la conformación en THSD7A que están presentes tanto en las proteínas THSD7A nativas como recombinantes.

Autoanticuerpos anti-THSD7A y actividad de la enfermedad. Las muestras de suero en serie de dos pacientes con iMN y positivas para anticuerpos anti-THSD7A estaban disponibles para el análisis de los niveles de anticuerpos anti-THSD7A mediante análisis de transferencia Western semicuantitativo. En un paciente, la terapia inmunosupresora indujo una disminución sustancial del nivel de anticuerpos anti-THSD7A, que fue seguida por una reducción de la proteinuria (Figura 3). Por otro lado, en un paciente que no recibió terapia inmunosupresora debido a quejas clínicas menores, el nivel de anticuerpos permaneció constantemente alto, con una proteinuria sostenida de intervalo nefrótico. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren una asociación entre el nivel de anticuerpos y la actividad clínica de la enfermedad.

Expresión glomerular de THSD7A en controles sanos y pacientes con MN. Con el fin de investigar la expresión glomerular de THSD7A, se realizaron análisis inmunofluorescentes e inmunohistoquímicos en muestras de biopsia de sujetos sanos y de pacientes con iMN. Se encontró una expresión glomerular lineal prominente de THSD7A en muestras de biopsia de riñones sanos cuando se sondearon con dos anticuerpos específicos anti-THSD7A diferentes. Los controles negativos que omiten el anticuerpo primario no mostraron tinción alguna. Cuando se tiñe la nefrina, una proteína transmembrana que se expresa en la región del diafragma de hendidura intercelular de los procesos de pie de podocitos, se observó un patrón de tinción muy similar al del THSD7A. Además, ambas moléculas mostraron una fuerte colocalización, lo que sugiere que THSD7A se encuentra en o cerca de los procesos de pie de podocitos. Por otro lado, THSD7A no se colocalizó con marcadores de la membrana basal glomerular, tal como el colágeno tipo IV y la fibronectina. Precisamente, THSD7A se localizó subepitelialmente en relación con el colágeno tipo IV y la fibronectina, lo que sugiere que se expresa en procesos de pie de podocitos en lugar de la membrana basal glomerular.

Se sabe por estudios previos que PLA2R1 se colocaliza con IgG4 en los depósitos subepiteliales de biopsias de pacientes con MN y anticuerpos detectables contra PLA2R1. Para investigar este fenómeno en pacientes con MN positivo anti-THSD7A, se realizó microscopía de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos anti-THSD7A así como anti-IgG4. Se encontró una fuerte tinción para IgG4 y THSD7A en todas las biopsias disponibles de pacientes con MN positivo anti-THSD7A (n = 5). De este modo, THSD7A se colocalizó con IgG4 en un patrón granular que es típico para MN.

La tinción inmunohistoquímica de THSD7A reveló una positividad lineal a lo largo de las membranas plasmáticas de podocitos en las muestras de biopsia de controles sanos. Por el contrario, PLA2R1 está ligeramente menos expresado. En las cinco biopsias disponibles de pacientes con MN positivo anti-THSD7A, la inmunohistoquímica reveló una tinción marcadamente mejorada para THSD7A en comparación con los controles normales. Por otro lado, la tinción de PLA2R1 fue normal en estos pacientes. Por el contrario, todos los pacientes investigados con anticuerpos anti-PLA2R1 tenían tinción normal para THSD7A, pero una tinción granular mejorada de PLA2R1, como se describió anteriormente. Todas las biopsias investigadas de pacientes con MN secundaria tenían tinción normal tanto para THSD7A como para PLA2R1.

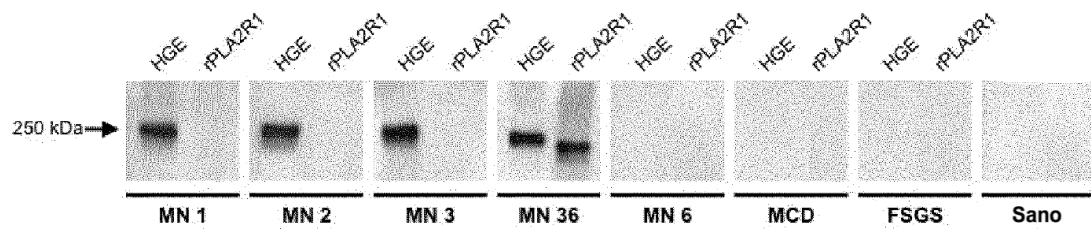
Elución de IgG anti-THSD7A de tejido de biopsia. La IgG se eluyó con ácido del núcleo de biopsia remanente congelado de un paciente cuyo suero fue reactivo con THSD7A, de dos casos de iMN asociada a PLA2R1 y de un caso de nefritis lúpica de clase V. La IgG del caso seropositivo anti-THSD7A reconoció específicamente THSD7A recombinante en transferencia Western, mientras que IgG eluida de los casos de MN asociados a PLA2R1 no reconoció THSD7A y reconoció específicamente PLA2R1. IgG eluida de la biopsia de nefritis lúpica clase V no reconoció ninguno de los antígenos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para diagnosticar y/o pronosticar la nefropatía membranosa en un paciente, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de detectar en una muestra biológica obtenida de dicho paciente uno o más autoanticuerpos que reconocen la proteína THSD7A (7A que contiene el dominio de Trombospondina, Tipo I).
2. El procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación **1**, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 - (i) poner en contacto una muestra biológica obtenida de dicho paciente con una proteína que incluye un polipéptido THSD7A o un fragmento de unión a anticuerpo del mismo, y
 - (ii) detectar cualquier complejo antígeno-anticuerpo formado,en el que la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo es indicativo de nefropatía membranosa.
3. El procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación **1 o 2**, en el que dicha nefropatía membranosa es una nefropatía membranosa idiopática.
4. El procedimiento *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones **1-3**, en el que dicha muestra biológica es una muestra de sangre.
5. El procedimiento *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones **1-4**, en el que dicho paciente es un paciente negativo para PLA2R1.
6. Un procedimiento *in vitro* para evaluar la efectividad de un tratamiento para la nefropatía membranosa, particularmente la nefropatía membranosa idiopática, en un paciente, que comprende:
 - (i) determinar en un primer punto de tiempo un nivel de autoanticuerpos anti-THSD7A en dicha muestra obtenida de dicho paciente en dicho primer punto de tiempo,
 - (ii) determinar en un segundo punto de tiempo un nivel de autoanticuerpos anti-THSD7A en dicha muestra obtenida de dicho paciente en dicho segundo punto de tiempo, y
 - (iii) comparar los niveles de autoanticuerpos de los dos puntos de tiempo,en el que:
 - una disminución en el nivel de autoanticuerpos anti-THSD7A en el segundo punto de tiempo en comparación con el primer punto de tiempo indica que el tratamiento es efectivo y/o
 - un aumento en el nivel de autoanticuerpos anti-THSD7A en el segundo punto de tiempo en comparación con el primer punto de tiempo indica que el tratamiento no es efectivo.
7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones **1 a 6**, en el que dicho procedimiento implica el uso de un dispositivo recubierto con la proteína que incluye un polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo.
8. Un kit para diagnosticar y/o pronosticar la nefropatía membranosa en un paciente, comprendiendo dicho kit:
 - una proteína aislada o recombinante que incluye un polipéptido THSD7A o un fragmento de unión a anticuerpo del mismo, y
 - un reactivo para la detección de un complejo antígeno-anticuerpo formado entre un polipéptido THSD7A o un fragmento de unión a anticuerpo del mismo y un autoanticuerpo dirigido contra THSD7A presente en la muestra biológica,en el que el fragmento de THSD7A comprende al menos el 96 % de la secuencia completa de aminoácidos de THSD7A.
9. El kit de acuerdo con la reivindicación **8**, comprendiendo dicho kit además un polipéptido PLA2R1 o un fragmento de unión a anticuerpo del mismo.
10. Un procedimiento *in vitro* para diagnosticar y/o pronosticar nefropatía membranosa, en un paciente, que comprende la etapa de determinar el nivel de THSD7A en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.
11. El procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación **10**, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas de:
 - (i) medir el nivel de proteína THSD7A en una muestra biológica obtenida de dicho paciente,
 - (ii) comparar dicho nivel con un nivel de referencia,en el que un mayor nivel de proteína THSD7A en comparación con dicho nivel de referencia es indicativo de una nefropatía membranosa.

12. El procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación **10 u 11**, en el que dicha nefropatía membranosa es nefropatía membranosa idiopática.
- 5 13. El procedimiento *in vitro* de acuerdo con las reivindicaciones **10 a 12**, en el que dicha muestra biológica es una biopsia de riñón.
14. Una proteína que incluye un polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo para usar en el tratamiento de nefropatía membranosa.
- 10 15. La proteína que incluye un polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo para usar de acuerdo con la reivindicación **14**, en la que dicha nefropatía membranosa es una nefropatía membranosa idiopática.
- 15 16. La proteína que incluye un polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación **14 o 15**, en la que dicho paciente es un paciente positivo para THSD7A.
- 20 17. Un dispositivo de diagnóstico recubierto con una proteína aislada o recombinante que incluye un polipéptido THSD7A o un fragmento del mismo, preferiblemente del grupo que comprende una perla, una partícula, un pocillo de microplaca, una matriz, una cubeta, un tubo y una membrana, en el que el fragmento de THSD7A comprende al menos el 96 % de la secuencia completa de aminoácidos de THSD7A.
18. Un autoanticuerpo aislado que reconoce un polipéptido THSD7A.

A. Reactividad con una proteína glomerular de 250 kDa de tamaño



B. Paciente

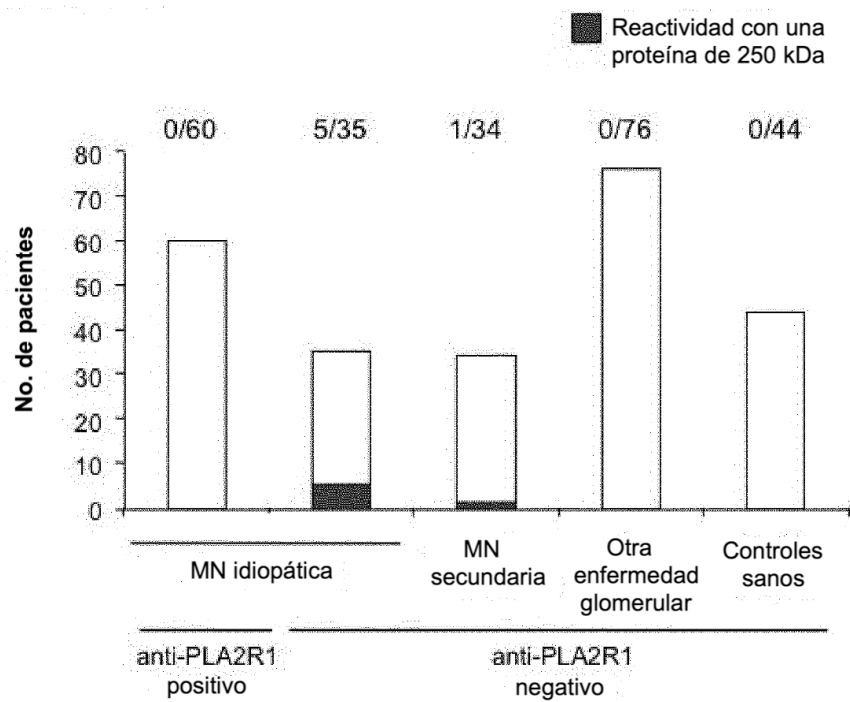
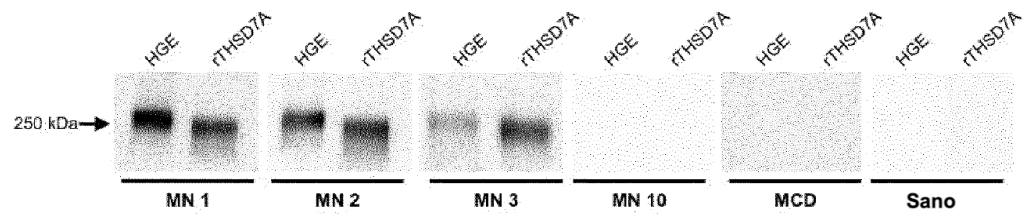


Figura 1

A. Transferencia Western con THSD7A recombinante



B. Inmunoprecipitación (IP)

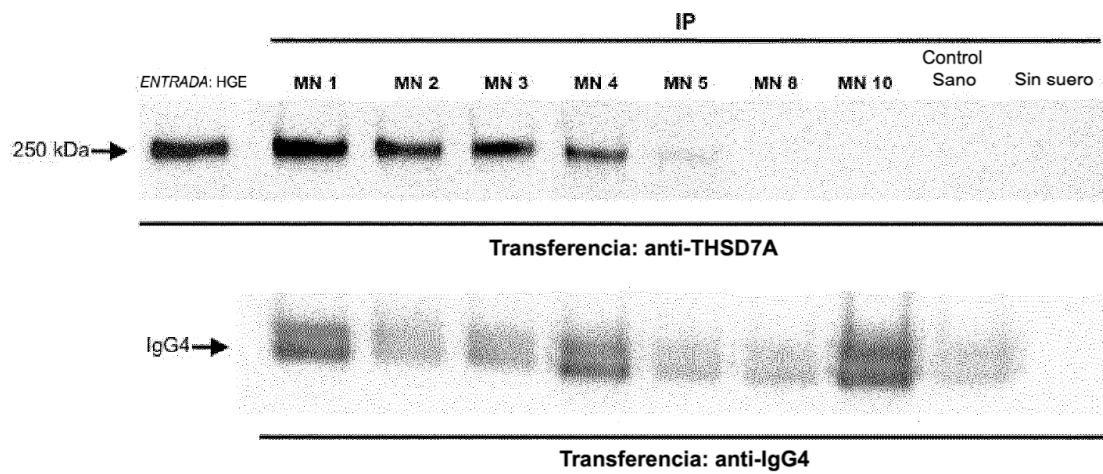


Figura 2

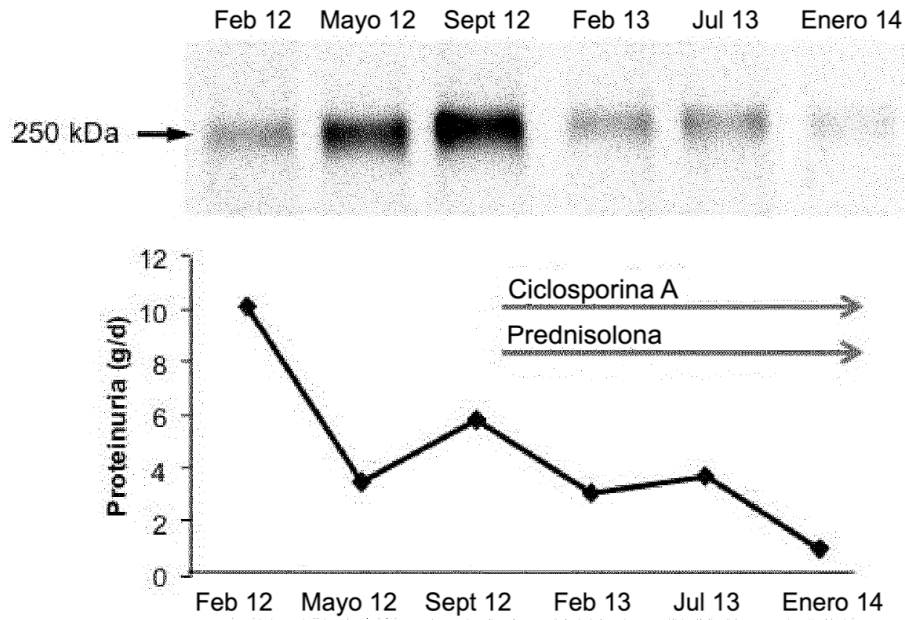


Figura 3

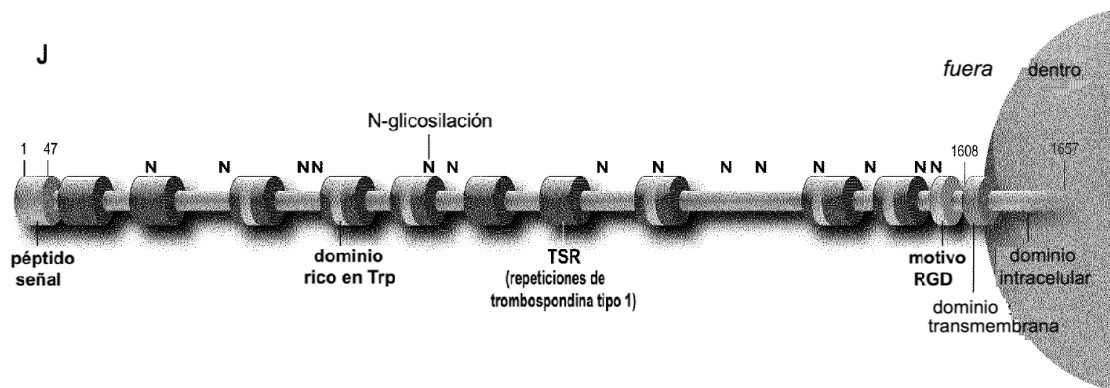


Figura 4