

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 470 816**

21 Número de solicitud: 201231815

51 Int. Cl.:

G01N 33/563 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

22.11.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

24.06.2014

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2013/070812

71 Solicitantes:

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (33.3%)

Avda de la Constitucion 18

41071 Sevilla ES;

**FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PARA LA
INVESTIGACIÓN DE MÁLAGA EN BIOMEDICINA
Y SALUD (FIMABIS) (33.3%) y**

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (33.3%)

72 Inventor/es:

FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ , Óscar;

OLIVER MARTOS, Begoña;

ÓRPEZ ZAFRA , Teresa;

PAVÍA MOLINA, José;

MAYORGA MAYORGA, Critobalina ;

LEYVA FERNÁNDEZ , Laura y

PINTO MEDEL , María Jesús

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **Proteína recombinante y usos en el diagnóstico de la esclerosis múltiple**

57 Resumen:

Proteína recombinante y usos en el diagnóstico de la esclerosis múltiple.

Proteína recombinante IFNAR2.3, anticuerpos, composiciones que los comprenden, y usos. Entre sus usos, especialmente, se refiere a un método para el diagnóstico de la esclerosis múltiple, así como al kit de diagnóstico.

ES 2 470 816 A1

DESCRIPCIÓN

Proteína recombinante y usos en el diagnóstico de la esclerosis múltiple.

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biomedicina y la biotecnología, y se refiere al receptor soluble IFNAR2.3 aislado, producido de manera recombinante, a un método de diagnóstico de individuos con esclerosis múltiple, a un kit y a sus usos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica inflamatoria y desmielinizante del sistema nervioso central (SNC), presumiblemente autoinmune. Se caracteriza por la presencia de lesiones inflamatorias en la sustancia blanca y gris del SNC, denominadas placas, en las que se produce pérdida de mielina y cierto grado de degeneración axonal.

Aunque en los últimos años se han desarrollado numerosos fármacos para paliar los efectos de esta enfermedad, el interferon beta (IFN β) sigue siendo el tratamiento más ampliamente utilizado. Numerosos ensayos clínicos han demostrado que disminuye la frecuencia y gravedad de los brotes, el número y volumen de las lesiones cerebrales observadas por resonancia y la progresión en la escala de discapacidad física. Sin embargo, un porcentaje importante de pacientes (30-50%) no responden adecuadamente al tratamiento, ya que continúan con la presencia de brotes y progresan en la escala de discapacidad física.

El IFN β ejerce su actividad biológica a través de la interacción con el receptor de superficie IFNAR formado por dos subunidades, IFNAR1 e IFNAR2. Tras la unión del IFN β a IFNAR2, se produce la dimerización de las dos subunidades y la activación de la cascada de señalización intracelular cuya señal es transducida al núcleo a través de la vía Jak-Stat. De esta forma se ejercen las actividades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras del IFN β .

La subunidad IFNAR2 del receptor sufre un procesamiento alternativo del ARNm que da lugar a tres formas distintas: una forma corta (IFNAR2b), una forma larga funcionalmente activa (IFNAR2c) y la forma soluble (sIFNAR2, IFNAR2.3 o IFNAR2a). Solamente IFNAR2c actúa como receptor funcional junto con IFNAR1 y es capaz de mediar los efectos biológicos del IFN β . IFNAR2.3 que carece de dominios citoplasmáticos y transmembrana, ha sido identificada en fluidos biológicos humanos y aunque su papel no está definido, se ha sugerido que pueda tener capacidad neutralizante de la unión del IFN β con el receptor IFNAR2. De esta forma podría ejercer funciones moduladoras según la concentración a la que se encuentre; por un lado podría neutralizar la unión del IFN β al receptor IFNAR o por el contrario, prolongar la vida media del IFN β circulante, impidiendo su degradación o la formación de oligómeros. A día de hoy sigue siendo desconocida la función de la variante soluble de IFNAR2.

El diagnóstico clínico de la EM es complejo. Éste se realiza teniendo en consideración la existencia de criterios clínicos de diseminación espacial (presenta de síntomas y signos que indiquen existencia de dos lesiones independientes en el SNC) y de diseminación temporal (dos o más episodios de disfunción neurológica).

Los estudios de conductividad nerviosa de los nervios ópticos, sensitivos y motores también proporcionan pruebas de la existencia de la enfermedad, ya que el proceso de desmielinización implica una reducción de la velocidad de conducción de las señales nerviosas. El estudio se realiza comparando los tiempos de reacción con mediciones preestablecidas.

El proceso de diagnóstico se completa con la realización de pruebas para excluir otras enfermedades que pueden imitar a la esclerosis como la Enfermedad de Devic, la sarcoidosis, la vasculitis y la enfermedad de Lyme.

Hasta el momento, la prueba paraclínica por excelencia para confirmar el diagnóstico de EM es la presencia de bandas oligoclonales (BOC) en líquido cefalorraquídeo, producidas por células situadas en el espacio subaracnoideo, que dan lugar a síntesis intratecal de IgG. El método más sensible para su detección es el isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida, que permite detectar BOC hasta en el 95% de los casos de EM. El principal inconveniente de esta técnica es la necesidad de realizar una punción lumbar al paciente, siendo un método invasivo para el paciente y costoso.

Sería útil, por tanto, encontrar una prueba paraclínica que consiga diagnosticar individuos con EM de una manera mucho menos invasiva, incruenta y por ello, más inocua para el paciente.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han desarrollado un método para diagnosticar la esclerosis múltiple, y han diseñado un ELISA cualitativo, tipo sándwich, para la determinación de IFNAR2.3 en suero. Para dar validez a este ensayo, han clonado y purificado la proteína IFNAR2.3, de forma que pueda servir como control positivo para incluir en el ensayo. Se ha realizado la optimización de cada uno de los pasos de la técnica y se ha calculado la variación intraensayo e interensayo de la misma. Una vez desarrollada y optimizada la metodología, se han determinado los valores de IFNAR2 soluble en suero de pacientes con EM y controles sanos.

PROTEÍNA RECOMBINANTE DE LA INVENCION.

Los autores de la invención han clonado y purificado la proteína IFNAR2.3. Además, mediante el método de clonación empleado han añadido una cola de histidina-asparagina en el extremo carboxi terminal, quedando fusionado a la proteína recombinante como una etiqueta. Tras la producción de la proteína recombinante en la célula hospedadora, se hace pasar el lisado celular por una columna de afinidad para su purificación. La proteína de fusión con la etiqueta queda retenida en la columna mientras que las otras proteínas y otros contaminantes son afluidos a través de ésta.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una proteína recombinante obtenible por un procedimiento que comprende:

- a) integrar un inserto con la secuencia nucleotídica SEQ ID NO. 1 en una construcción genética o un vector de expresión,
- b) transformar un hospedador con el vector de expresión del paso (a),
- c) inducir la expresión de la proteína recombinante,
- d) extraer la proteína recombinante, y
- e) purificar la proteína recombinante

El diseño del vector basado en técnicas de ingeniería genética y la elección de la célula hospedadora determinan, en gran parte, las características de la proteína recombinante.

La construcción génica de la invención puede comprender, además de la secuencia nucleotídica SEQ ID NO. 1, elementos que regulan la expresión de dicha secuencia. Dichos elementos reguladores incluyen promotores y potenciadores. Los promotores se encuentran típicamente posicionados en posición 5' con respecto al sitio de iniciación de la transcripción o traducción. Los potenciadores son capaces de influenciar la expresión de genes cuando se encuentran en posición 5' o 3' con respecto al ADNc o cuando se encuentran formando parte de un intrón. Secuencias reguladoras incluyen, además de promotores, secuencias que facilitan la traducción, señales de procesamiento para los intrones, codones de terminación, secuencias señales, sitios internos de unión al ribosoma (IRES) y señales de poliadenilación.

El vector de expresión que comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO. 1 o una construcción génica de la invención, está operativamente acoplado con una secuencia que regula la expresión de dicha secuencia nucleotídica SEQ ID NO. 1 o de dicha construcción génica. El experto en la materia advertirá que el tipo de vector adecuado para la expresión de los ácidos nucleicos y construcciones génicas de la invención, dependerá del organismo en el que se desee expresar el polinucleótido de la invención.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el vector de expresión es el vector prelinearizado pEcoli-Cterm 6xHN Linear.

Una célula o un organismo hospedador puede comprender la construcción génica de la invención o un vector, tal como se ha definido en la invención. En principio, cualquier tipo de organismo hospedador conocido para el experto en la materia puede ser usado en la presente invención, tales como una cepa bacteriana (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y similares), una cepa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha* y similares), una planta transgénica (dicotiledoneas o monocotiledoneas), una célula de insecto, por ejemplo, baculovirus, una célula de mamífero (células COS, CHO, C127, HeLa y similares) y un transgénico no humano (por ejemplo, un ratón, una vaca, una cabra, un conejo, un cerdo, etc.).

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el hospedador del paso (b) son bacterias de expresión. Más preferiblemente las bacterias de expresión son BL21(DE3). Las bacterias de expresión BL21(DE2) son células de *Escherichia coli* químicamente competentes, que posee un genotipo adecuado para la transformación y la expresión de proteínas, y cuyo genoma se conoce (Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3). Jeong H, *et al.* J Mol Biol 2009 Dec 11).

Una bacteria competente, se caracteriza por tener una pared bacteriana debilitada y por tanto tiene más facilidad para captar un ADN foráneo mediante un proceso de choque térmico o eléctrico (transformación). Para la producción de la proteína se utilizan bacterias de expresión. En esta memoria, las bacterias de expresión son aquellas que poseen la maquinaria necesaria para sobreexpresar el cDNA insertado y producir la proteína recombinante.

En otra realización preferida, la integración de la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1 del paso (a) se realiza mediante un proceso de ligación.

Para la realización del proceso de ligación, la mezcla de inserto: plásmido fue resuspendida en el producto In-Fusion Dry-Down pellet (Clontech). In-Fusion Dry-Down pellet es un liofilizado que contiene la enzima In-Fusion, la cual favorece la unión del inserto al plásmido gracias a la homología en la secuencia nucleotídica presente en ambos.

Por tanto, en otra realización preferida de la invención, en la ligación se emplea un liofilizado que comprende la enzima In-Fusion. Ésta es una ADN polimerasa de Poxvirus con actividad exonucleasa 3'-5', que es capaz de unir moléculas de ADN de cadena simple que presentan secuencias cortas y homólogas en sus extremos, tales como un producto de PCR amplificado y un vector.

5 En otra realización preferida, el inserto se sintetizó empleando los cebadores de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

10 Otro aspecto se refiere a una proteína que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2, o a la proteína recombinante de la invención, para su uso como medicamento; o, alternativamente, a una proteína que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2 o a la proteína recombinante de la invención para su uso en la elaboración de un medicamento.

Otro aspecto se refiere a una proteína que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2, o a la proteína recombinante de la invención, para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple, o alternativamente, al uso de una proteína que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2, o a la proteína recombinante de la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

15 ANTICUERPOS Y COMPOSICIONES DE LA INVENCION, Y USOS

Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de unirse a la proteína recombinante de la invención son también un objeto de la presente invención. Estos anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden obtener fácilmente a partir de antisueros.

20 Los antisueros para la proteína recombinante descrita en la presente invención pueden ser generados por técnicas estándar, por ejemplo, por inyección de la proteína recombinante de la invención en un animal apropiado y recogida y purificación de los antisueros de los animales. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen a la SEQ ID NO: 2, o una secuencia variante de la misma de acuerdo con la invención pueden ser identificados por inmunoensayos estándar. Los anticuerpos así obtenidos (en lo sucesivo, anticuerpos de la invención) se pueden usar para el método de diagnóstico de la invención. Preferiblemente, los anticuerpos o fragmentos de los mismos son anticuerpos monoclonales.

30 Así pues, en otro aspecto la invención se relaciona con un anticuerpo o un fragmento del mismo que reconoce específicamente la proteína recombinante de la invención, de ahora en adelante anticuerpo de la invención. Anticuerpos contemplados en el contexto de la presente invención incluyen antisueros policlonales, moléculas de IgG purificadas, sobrenadantes o líquido ascítico que contiene anticuerpos monoclonales, fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, ScFvdiabodies, triabodies, tetrabodies y anticuerpos humanizados.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende:

- a) una proteína que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2,
- b) la proteína recombinante de la invención, y/o

35 c) el anticuerpo, o un fragmento del mismo, de la invención.

40 Dicha composición puede ser una composición farmacéutica. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas, de ahora en adelante composiciones farmacéuticas de la invención, que comprenden al menos uno de los polinucleótidos de la invención, polipéptidos de la invención o su forma madura, y/o un anticuerpo de la invención, acompañado de un excipiente farmacéuticamente aceptable. Para uso en medicina, los compuestos y combinaciones de compuestos de la invención pueden ser formulados conjuntamente con un excipiente que es aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Excipientes preferidos para su uso en la presente invención incluyen azúcares, almidones, celulosas, gomas, proteínas y otros. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se formulará en una forma farmacéutica de administración sólida (p.ej., comprimidos, cápsulas, grageas, gránulos, supositorios, etc.) o líquida (p.ej., soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.). En otra realización particular, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas por cualquier ruta, incluyendo, sin ser limitante, oral, intravenosa, intramuscular, intrarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual o rectal.

50 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica de la invención para su uso como medicamento, o alternativamente, al uso de una composición farmacéutica de la invención en la elaboración de un medicamento.

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades o prevención de estados fisiológicos no deseados en el hombre y los animales.

Otro aspecto se refiere a la composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple, o alternativamente, al uso de la composición farmacéutica de la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE LA INVENCION

5 Los autores de la invención han visto que la capacidad discriminante de la detección en suero de IFNAR2.3 por sí sola, entre pacientes con EM y controles es elevada teniendo en cuenta que estamos ante un indicador univariante, y han desarrollado una técnica de ELISA para la detección de IFNAR2 soluble en suero, que sirve como prueba paraclínica para diagnóstico de la EM. Es una técnica mucho menos invasiva para el paciente y menos costosa que las bandas oligoclonales, y podría utilizarse como un método de screening previo, de forma que solo en el caso de
10 pacientes que obtengan valores de ELISA que puedan dar lugar a duda, sería necesario realizar las bandas oligoclonales. Para ello, tras la normalización de los datos de absorbancias y el establecimiento de un punto de corte para distinguir entre positivo y negativo, se ha obtenido una curva COR con un área bajo la curva de 0.820, y se han establecido diferentes puntos de corte que darán diferente sensibilidad y especificidad según los requerimientos que se le exija al test.

15 Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de *IFNAR2.3* para el diagnóstico de individuos con esclerosis múltiple.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles, de ahora en adelante primer método de la invención, para el diagnóstico de individuos con esclerosis múltiple, que comprende:

- a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y
- 20 b) detectar el producto de expresión de *IFNAR2.3*

En otra realización preferida, el primer método de la invención además comprende:

- c) comparar el producto de expresión de *IFNAR2.3* obtenido en el paso (b) con una cantidad de referencia

25 La cantidad de referencia se obtiene a partir de los valores de expresión constitutiva de *IFNAR2.3*, en un grupo de individuos sanos o, alternativamente, que no presentan esclerosis múltiple. Las cantidades de referencia adecuadas pueden ser determinadas por el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia que puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. Así, por ejemplo pero sin limitarnos, la muestra de referencia pueden ser los controles negativos, esto es, las cantidades detectadas por el método de la invención en muestras de individuos que no padecen la enfermedad que se pretende diagnosticar. Preferiblemente, el producto de expresión de *IFNAR2.3* del paso (b) del primer método de la invención
30 es la proteína IFNAR2.3. En otra realización más preferida, el paso (c) de la invención comprende comparar la detección de la proteína IFNAR2.3 en la muestra biológica de (a) con la detección de la proteína IFNAR2.3 en una población de referencia.

35 Los pasos (b) y/o (c) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (b) o la comparación computerizada en el paso (c).

Una "muestra biológica aislada" incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Preferiblemente, la muestra biológica aislada de un individuo del paso (a) es suero. En otra realización preferida, la muestra biológica aislada de un individuo del paso (a) es líquido cefalorraquídeo.

40 El término "individuo", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. El término "individuo" no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física.

La detección del producto de expresión de *IFNAR2.3* puede realizarse por cualquier medio conocido en el estado de la técnica.

45 La medida del producto de expresión de *IFNAR2.3*, aunque puede ser cualitativa, también puede determinarse la cantidad o la concentración de dicho producto de expresión, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa, y puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración del producto de expresión de los genes, basada en una señal que se obtiene directamente de la detección de la proteína. Dicha señal – a la que también podemos referirnos como señal de
50 intensidad – puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de dichos productos. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, "etiquetas" o productos de reacción enzimática).

5 intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de dichos productos de expresión obtenidos mediante medida directa. Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en otra parte del presente documento.

10 productos de expresión de *hTRIMERS* en una muestra problema frente a la población de referencia, o
alternativamente.

15 junto con la muestra biológica problema. La comparación descrita en el apartado (c) del método de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

20 procesamiento alternativo del ARNm que da lugar a tres formas distintas: una forma corta (sIFNAR2b), una forma larga funcionalmente activa (IFNAR2c) y la forma soluble (sIFNAR2, IFNAR2.3 o IFNAR2a). Solamente IFNAR2c actúa como receptor funcional junto con IFNAR1 y es capaz de mediar los efectos biológicos del IFN β , a través de la activación de la cascada de señalización JAK-STAT.

25 L41943.1 y en la SEQ ID NO: 2. Dicha SEQ ID NO2 está representada por la siguiente secuencia aminoacídica:

(MLLSQNAFIFRSLNLVLMVYISLVFGISYDSPDYTDESCTFKISLRNFRSILSWELKNHSIVPTHYTLTYTIMSKPEDLKV
VKNCANTTRSFCDLTDEWRSTHEAYVTVLEGFSGNTTLFSCSHNFWLAIDMSFEPPEFEIVGFTNHINVMVKFPSIVEE
ELQFDLSLVIEEQSEGIVKKHKPEIKGNMSGNFTYIIDKLIPNTNYCVSVYLEHSDEQAVIKSPLKCTLLPPGQSEFS).

30 En el contexto de la presente invención, el NÚCLEO se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 2, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2.

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a).

35 c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético.

40 la SEQ ID NO: 1. Dicha SEQ ID NO1 está representada por la siguiente secuencia nucleotídica:

45 gaggagcacacatcagggctcattgacatcctctcttagaaggaattacagcgggaatacaaatcgtgttcagtgctatacaaatcttgctgctcattagacatgctttgaa
ccaccagatttgattgattggtttttaccacccacctaattgattgatgttgaaatttccatctattgcttgaggaaagaattacagcttgatttattctctgcctcaggaagaacagt
cagagggaattgttaagaagacataaaccggaaataaaaggaacatgagtggaaatttccattatcattatcagacagtgtaattccaacacgaactactgtgtatctg
tttatttagagcacagtgatgagcaagcagtaataaagctcccttaaaatgcacccctcctccacctggtccaggaaatcagaattttcataacttttagcctggccatttcc
taacctgccaccgttggaagccatggatatgtgtggaggtcatttacatcaacagaaagaagaaagtgtgggattataattatgatgatgaaagtgatagcgatactga
50 ggacagcgcccaggacaagtgggcggtggcattaccatgcatggactgactgtcaggcctctgggtcaggcctctgccacctctacagaattcccagattgatagaccg
gagtcgcaggaggagcctgactgcctgagtgattgaggactccccacgatgcgaaggacagccctcagcagtggttggaactctgagtggtggcctgtgagagg
agaaagagctccactccaggaccttttccggaagaggactacagctccagcagggtgtggggcagaaattacctcaattggtgacttaacctgtgtgtttgaga
gttcttgatgacgaggacagtgacgacttagaagcccctctgatgctatcgtctcatctggaagagatggttgaccagaggatcctgataatgtgcaatcaaacattt
gctggccagcggggaagggacacagccaacctttcccagcccctcttcagagggcctgtgtgctcgaagatgctccatctgatcaaagtgacacttctgagtcagatg
55 ttgacctgtgggatgtgtatataatgagatgactccaaaactattgaatgaactgtgacagacaagcacctacagggttctgtctctgcatcctaactgtctgccttaatc
tctgcaagtggttctccaagggaaggagggaactgtggtgttcctttctccagtgacatcacctatgacacattcccagtagtggggaccatgatatcattcagtgcat
tgtttacatattcaaagtgtgtgacctttgaaggacatgtgcaccttcttcactaatgacacttaggatgtttctgcatatgtctaccaggagcaggttggttcccaca
cagtttcagaggtgtgtccaggaccctatgataattctctcttcgttctttttttttttttggaacagagatcctgtctgtcgcgccaagctgagcgcaatggtgtgacttggt

cactgcaacatccgcctcccggttcagggtgattctcctgcctcagcctccctcgcaagtagctgggattacaggcgctgccaccatgcctagcaaatgtttgtatttta
gtggagacaggattttaccatgttgccagggtggtctgaactcctgacctaagtgatctgccctcctcagcctcgtaaagtgtgggattacaggggtgagccgct
gtgcctggctggccctgtgatatttctgtgaaataaattgggccagggtgggagcagggaaagaaaagaaatagtagcaagagctgcaaagcaggcaggaa
gggaggaggagagccagggtgagcagtgagagagaagggggccctgcacaaggaaacaggaagagccatcgaagtttcagtcggtgagccttgggcacctc
acccatgtcacatcctgtctcctgcaattggaattccacctgtccagcctccccagttaaagtggggaagacagacttaggatcacgtgtgtgactaatacagaaa
ggaaacatggcgctcgggagaggataaaacctaagtcctatatttaagttaaaaaa).
5

En otra realización preferida, la detección de la cantidad de producto de expresión de *IFNAR2.3* se realiza mediante un inmunoensayo. El término "inmunoensayo", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier técnica analítica que se basa en la reacción de la conjugación de un anticuerpo con un antígeno. Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: *immunoblot*, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, x-map o *chips* de proteína.
10

En otra realización preferida, el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). El ELISA se basa en la premisa de que un inmunorreactivo (antígeno o anticuerpo) puede ser inmovilizado en un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario que puede unirse a un compuesto marcador. Existen diferentes tipos de ELISA: ELISA directo, ELISA indirecto o ELISA sándwich. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el ELISA es un ELISA sándwich.
15

El término "compuesto marcador", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de dar lugar a una señal cromogénica, fluorogénica, radiactiva y/o quimioluminiscente que permita la detección y cuantificación de la cantidad de anticuerpos frente a *IFNAR2.3*. El compuesto marcador se selecciona de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa. Este compuesto marcador puede unirse al anticuerpo directamente, o a través de otro compuesto. Algunos ejemplos de compuestos marcadores que se unen directamente son, pero sin limitarse, enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, isótopos radiactivos como ³²P o ³⁵S, fluorocromos como fluoresceína o partículas metálicas, para su detección directa mediante colorimetría, auto-radiografía, fluorimetría, o metalografía respectivamente.
20
25

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de diagnóstico, pronóstico y de clasificación de individuos, de ahora en adelante tercer método de la invención, que comprende los pasos (a)-(c) según el primer método de la invención, y que además comprende asignar al individuo del paso (a) al grupo de individuos con o sin esclerosis múltiple, en función del punto de corte establecido para el índice de muestra. Valores con el índice de muestra por encima de 2,14 (en la curva COR) nos permite clasificar a los sujetos como pacientes con EM, mientras que valores inferiores a 1,24 (en la curva COR) son clasificados como individuos sanos.
30

KIT O DISPOSITIVO DE DIAGNÓSTICO Y USOS

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante kit o dispositivo de la invención, que comprende los elementos necesarios para cuantificar el producto de expresión de *IFNAR2.3*.
35

Preferiblemente, el kit o dispositivo de la presente invención comprende al menos un anticuerpo anti-*IFNAR2.3*. En otra realización preferida, el kit de la invención comprende anticuerpos secundarios o controles positivos y/o negativos. En una realización mucho más preferente el kit comprende el polipéptido de la invención, producido por tecnología recombinante, como control positivo. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc.
40

Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.
45

En otra realización preferida, el kit de la invención comprende:

- a) un soporte sólido que lleva unido un anticuerpo primario
- b) anticuerpo secundario
- c) una solución del anticuerpo de detección, marcado con un marcador enzimático;
- d) un reactivo.

En una realización aún más preferida, el anticuerpo de primario es un anticuerpo que comprende la secuencia aminoacídica
SEQ ID NO: 3
(MLLSQNAFIVRSLNLVLMVYISLVFGISYDSPDYTDESCTFKISLRNFRSILSWELKNHSIVPTHYLLYTIMSKPEDLKV
VKNCANTTRSFCDLTDWEWRSTHEAYVTVLEGFSGNTTLFSCSHNFWLAIDMSFEPPEFEIVGFTNNHINVMVKFSPSIVEE
ELQFDLSLVIEEQSEGIVKKHKPEIKGNMSGNFYIIDKLIPNTNYCVSVYLEHSDEQAVIKSPLKCTLLPPGQESAE
AKIGGIITVFLIALVLTSTIVTLKWIGYICLRNSLPKVLRLQGLTKGWNVAIHRCSHNALQSETPELKQSSCLSPSSWDY
KRASLCPSD).
55

En otra realización más preferida, el anticuerpo secundario es un anticuerpo que comprende la secuencia aminoacídica

SEQ ID NO: 4
(MLLSQNAFIVRSLNVLVMVYISLVFGISYDSDPYTDESCTFKISLRNFRSILSWELKNHSIVPHTHYTLLYTIMSKPEDLKV
VKNCANTTRSFCDLTDEWRSTHEAYVTVLEGFSGNTTLFSCSHNFWLAIDMSFEPPEFEIVGFTNHINVMVKFPSIVEE
5 ELQFDLSLVIEEQSEGIVKKHKPEIKGNMSGNFTYIIDKLIPNTNYCVSVYLEHSDEQAVIKSPLKCTLLPPGQESESAES
AKIGGIITVFLIALVLTSTIVTLKWIGYICLRNSLPKVLRRGLTKGWNAVAIHRCSHNALQSETPELKQSSCLSFPSSWDY
KRASLCPD)

Otro aspecto se refiere al uso del kit de la invención, para el diagnóstico, pronóstico, y clasificación de individuos que tienen esclerosis múltiple.

- 10 Otro aspecto de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención (del primer o del segundo método de la invención).

Otro aspecto de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

- 15 El primer y/o el segundo método de la invención pueden incluir etapas adicionales, como por ejemplo, la separación de proteínas mediante electroforesis mono y bidimensional (2D-PAGE), o la digestión previa con tripsina de una mezcla de proteínas (de la muestra) para después purificar y analizar los péptidos mediante espectrometría de masas (MS), como el MALDI-TOF, o mediante cromatografía multidimensional, mediante ICAT (*Isotope-coded affinity tags*), DIGE (*Differential gel electrophoresis*) o arrays de proteínas.

- 20 Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxiribonucleótidos (ADN ó DNA).

Los términos "secuencia aminoacídica", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

- 25 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1: Esquema de trabajo de la clonación, producción y purificación la proteína recombinante.

Fig. 2: Estructura del vector pEcoli-Cterm 6xHN Linear.

Fig. 3: Estructura de las estructuras flanqueantes al inserto.

- 35 **Fig. 4:** Electroforesis en gel de agarosa del amplificado obtenido por PCR.

Fig. 5: Alineamientos de las secuencias nucleotídicas en sentido 5'-3'. En la primera línea se muestra la secuencia nucleotídica de IFNAR2.3, en la segunda y tercera línea las secuencias nucleotídicas con los cebadores flanqueantes del inserto T7UP y T7terminal, obtenida tras el proceso de secuenciación del plásmido.

Fig. 6: Western blot que muestra la banda correspondiente a IFNAR2.3

- 40 **Fig. 7:** Gráficas de la puesta a punto de las concentraciones de anticuerpos para el ELISA para determinar IFNAR2.3 en suero. (A). Absorbancias obtenidas con 1.2µg/ml de anticuerpo primario frente a diferentes concentraciones de anticuerpo secundario (B). Absorbancias obtenidas con 1.µg/ml de anticuerpo primario frente a diferentes concentraciones de anticuerpo secundario (C). Absorbancias obtenidas con 0,8 µg/ml de anticuerpo primario frente a diferentes concentraciones de anticuerpo secundario (D). Gráfica que muestra la relación lineal entre la absorbancia y la concentración de proteína IFNAR2.3.

Fig. 8. Análisis de los valores de IFNAR2.3 en suero en pacientes tratados con INFβ, sin tratamiento y controles.

Fig. 9. Análisis de los valores de IFNAR2.3 en suero en pacientes tratados con INFβ, sin tratamiento, controles y pacientes tratados con Copaxone®.

Fig. 10. Curva COR pacientes sin tratamiento y controles.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores.

Materiales y métodos

Producción de la proteína recombinante IFNAR2.3

5 Elección del vector de clonación

El sistema de expresión procariota escogido, es el vector prelinearizado pEcoli-Cterm 6xHN Linear (Clontech). La proteína resultante tendrá fusionada una cola histidina-asparagina en el extremo carboxi terminal que servirá para su purificación.

10 En las imágenes que se muestran a continuación se detalla la estructura del vector donde se integró el inserto con la secuencia nucleotídica de nuestra proteína de interés.

El sistema de expresión de pEcoli Cterm 6xHN Linear está basado en el sistema de expresión del promotor fuerte T7, controlado por el operón LacZ que a su vez es inducible por IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido). Además, el plásmido posee un gen de resistencia a la ampicilina que permite la selección de los clones que contienen el plásmido.

15 Para la producción de la proteína, se utilizó la maquinaria de las bacterias de expresión BL21 (DE3), que utilizan el promotor T7. Las bacterias BL21 (DE3) contienen una copia cromosomal del gen de la T7 ARN polimerasa, que a su vez está bajo el control del promotor de lacUV5 inducible por IPTG.

Síntesis del inserto de ADN

20 El primer punto en el diseño de la estrategia de clonación fue la síntesis del inserto. Para ello se recabó toda la información sobre la secuencia de IFNAR2.3, como la secuencia señal del péptido, las modificaciones postraduccionales, las características bioquímicas de la proteína, los dominios de la misma etc. Toda esta información se obtuvo de la base de datos UNIPROT (<http://www.uniprot.org/uniprot/P48551>), que alberga las secuencias aminoácidas de las proteínas y sus características bioquímicas.

25 La secuencia del ARNm de IFNAR2.3 se obtuvo a partir de la base de datos NUCLEOTIDE del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>.)

Siguiendo las directrices del fabricante, los cebadores debían de cumplir los siguientes requisitos:

El extremo 5':

- Contener 15 bases homólogas con las 15 bases del final del fragmento de ADN del vector donde va a ser insertado.

30 El extremo 3':

- Poseer 15 bases homólogas con los extremos del gen que va a ser insertado.
- Una longitud entre 18-25 pb y un contenido de GC del 40-60%.
- Ausencia del codón de inicio (ATG) y de parada en la secuencia a amplificar.
- Ausencia de la secuencia señal.

35 Teniendo en cuenta estas premisas, los cebadores daban un producto tras la amplificación de 638 pb. Las secuencias de los cebadores fueron:

Sentido (secuencia SEQ ID NO. 3):

5'TAAGGCCTCTGTCGACATTTTCATATGATTCGCCTGATTACACGATG 3'

Antisentido (secuencia SEQ ID NO. 4):

40 5'CAGAATTCGCAAGCTTTGAAAATTCTGATTCCTGGCCAGGTGGAA 3'

El inserto se sintetizó mediante PCR convencional a partir de los cebadores diseñados en el punto anterior, empleando una Taq de alta fidelidad y utilizando como molde un ADNc proveniente de una mezcla de ADNc humano comercial. Las condiciones óptimas de concentraciones, temperatura y tiempos para la síntesis del inserto fueron las siguientes:

Tabla 1: resumen de los reactivos de la PCR convencional para la síntesis del inserto.

Reactivos	Volumen/ muestra	Concentración final/ muestra
Agua libre de Rnasas	40 µl	
Cebador sentido (20 µM)	1 µl	0,4 µM
Cebador antisentido (20 µM)	1 µl	0,4 µM
Dntp (10 µM)	1 µl	0,2 µM
Tampón 5X	5 µl	1X
Pfu High Fidelity	1 µl	
cDNA	1 µl	

Condiciones de temperatura:

Tabla 2: resumen de las condiciones de temperatura para la síntesis del inserto mediante PCR convencional.

- 5 El producto final obtenido de la PCR, fue separado en función de su tamaño mediante la técnica de electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 2% disuelta en tampón TAE, junto con el intercalante Gold View Nucleic Acid Satín (Sbs Genetech) a una dilución 1/20. El gel fue sometido a una corriente constante de 80 V y fue visionado en un transiluminador de ultravioleta, que permitió localizar la banda de interés en función del número de pares de bases. La banda localizada a la altura de 638 pb fue recortada del gel de agarosa con la ayuda de un bisturí.

- 10 La secuencia del inserto amplificada contenida en la agarosa, fue purificada con el kit comercial QIAquick Gel

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Desnaturalización	95°C	20 seg	
Anillamiento	60,4 °C	20 seg	40 ciclos
Extensión	72°C	30 seg	
Extensión final	72°C	10 min	1
Etapas final	4°C	Infinito	

Extraction (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante. Al final del proceso se obtuvo un eluido, que fue cuantificado con un espectrofotómetro (Nanodrop, Thermo) antes de ser almacenado a -20°C.

Proceso de ligación

- 15 Siguiendo el esquema de trabajo, el siguiente punto en el proceso de clonación, fue el proceso de ligación, es decir, "pegar" al plásmido, la secuencia nucleotídica de IFNAR2.3, que dará lugar a la proteína recombinante.

Para determinar las concentraciones y los volúmenes del inserto y del plásmido, la casa comercial Clontech, en su web ofrece una herramienta informática (<http://bioinfo.clontech.com/infusion>) para calcular las cantidades óptimas del vector y del inserto, para el proceso de ligación a partir de las variables conocidas longitud del vector y del inserto.

- 20 Para la realización del proceso de ligación, la mezcla de inserto: plásmido fue resuspendida en el producto In-Fusion Dry-Down pellet (Clontech). In-Fusion Dry-Down pellet es un liofilizado que contiene la enzima In-Fusion, la cual favorece la unión del inserto al plásmido gracias a la homología en la secuencia nucleotídica presente en ambos. La reacción de ligación fue llevada a cabo en un termociclador, a 37°C durante 15 minutos seguida de 15 minutos a 50°C y posteriormente fue transferido a hielo. Finalmente, el producto de ligación fue resuspendido en 40 µl de tampón TE (Tris-HCl, EDTA) a pH 8.

- 25

Transformación en bacterias replicativas

Las bacterias competentes utilizadas fueron MAX Efficiency DH5α™ Competent Cells (Invitrogen) las cuales fueron transformadas con el plásmido, siguiendo el siguiente protocolo:

Como control positivo de la técnica de transformación, se añadieron 5 µl del plásmido pUC19 (control positivo) en una alícuota de bacterias competentes y se resuspendió suavemente esta mezcla. De forma paralela, se transformaron las bacterias con el producto de ligación. Para ello, se añadieron 2,5 µl a una alícuota de bacterias competentes y se mezcló suavemente. A continuación, ambas alícuotas de bacterias (control y problema) fueron incubadas durante 30 minutos en hielo. Pasado este tiempo, las muestras se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Rápidamente, las muestras fueron transferidas a hielo durante 2 minutos y posteriormente se añadieron 900 µl de medio SOC (el cual favorece el proceso de transformación). Para que el plásmido expresara la resistencia a ampicilina, las muestras fueron incubadas a 37°C, con agitación de 225 rpm durante 1 hora. Finalmente las bacterias transformadas, fueron sembradas a diferentes volúmenes en placas de LB-Agar suplementadas con ampicilina 100 µg/ml e incubadas toda la noche a 37°C.

Purificación del ADN plasmídico y verificación del marco de lectura

Trascurrida una noche en el incubador, las bacterias habían formando UFC (unidades formadoras de colonias). Para evaluar las características de cada UFC, éstas fueron aisladas de forma independiente con la ayuda de un hilo de siembra y sembradas en tubos con 4 ml de medio LB Broth suplementados con 100 µg/ml de ampicilina. Estas suspensiones fueron incubadas a 37°C durante toda la noche con una agitación de 220 rpm junto con un control negativo que fue un tubo de LB Broth sin bacterias. Posteriormente, se procedió a la purificación del plásmido contenido en las bacterias, siguiendo las indicaciones del kit de Promega (PureYield™ Plasmid Miniprep System) como se explican a continuación:

El cultivo de bacterias fue alicuotado en tubos de 1.5 ml y centrifugado a 16000g durante 30 segundos en una microcentrifuga. Del producto obtenido, se descartó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 600 µl de agua, al cual se le añadió 100µl de tampón de lisis celular y fue mezclado por inversión. A esta mezcla se le añadieron 350µl de solución neutralizante y se mezcló de nuevo por inversión. A continuación, se centrifugó a 16000g durante 3 minutos. El sobrenadante obtenido fue transferido a una de las minicolumnas que proporciona el kit que retiene el ADN. Se volvió a centrifugar a 16000g durante 15 segundos. A continuación, se le añadieron 200µl de solución de lavado a la minicolumna y se volvió a centrifugar durante 15 segundos. Posteriormente, se añadieron 400µl de solución de lavado a la minicolumna y se centrifugó durante 30 segundos. Finalmente para eluir el ADN que había quedado retenido en la membrana, se transfirió la minicolumna a un tubo de microcentrifuga limpio de 1.5 ml, se le añadieron 30µl de agua estéril al centro de la membrana y se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente, para obtener el ADN plasmídico purificado se centrifugó a 16000g durante 15 segundos. El ADN plasmídico fue cuantificado mediante absorbancia en el espectrofotómetro (Nanodrop, Thermo) y fue almacenado a -20°C hasta el momento de su uso.

En este punto teníamos diferentes UFC aisladas y congeladas, pero se desconocía si el plásmido poseía el inserto, su secuencia completa, la orientación en el marco abierto de lectura etc, por tanto se debía comprobar que el plásmido cumplía con todos los requisitos deseados. Para ello se realizaron dos pruebas:

- PCR convencional utilizando como ADN molde el ADN plasmídico.
- Secuenciación de ADN: Los plásmidos positivos en la PCR, fueron secuenciados para obtener la secuencia nucleotídica que nos permitiría evaluar la secuencia del inserto y comprobar la orientación del mismo.

La secuenciación del inserto abarcaba secuencias aguas arriba que coincidían con el promotor del T7 y aguas abajo con la secuencia T7 terminal. Las secuencias obtenidas fueron alineadas en sentido 5'3' con la secuencia de referencia del NCBI de número de GeneBank: CAA61940.1 mediante el programa bioinformático Multalin. A continuación se muestra los resultados obtenidos tras el alineamiento que nos cercioraba la integridad de la secuencia y orientación en el marco de lectura correcto:

Transformación en bacterias de expresión BL21 (DE3)

Una vez verificado el clon que contenía el plásmido con las condiciones correctas, el plásmido se transformó en las bacterias de expresión BL21(DE3) para la producción de la proteína recombinante IFNAR2.3, siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente para la transformación en bacterias replicativas y detección del plásmido.

Inducción de la expresión de la proteína recombinante IFNAR2.3

En condiciones normales, en las bacterias BL21 (DE3) transformadas con el plásmido, la proteína recombinante no se está expresando porque su expresión está reprimida por el represor Lac (LacI) que se encuentra unido al operon Lac. Para permitir su expresión, es necesario la adición de IPTG que actúa como inductor secuestrando al represor y permitiendo que la T7 ARN polimerasa se una al promotor T7 y realice el proceso de transcripción. Para inducir la expresión de la proteína recombinante IFNAR2.3 se siguió el siguiente protocolo:

En el día previo a la inducción de la producción de la proteína, se preparó un precultivo de la siguiente manera:

- Las bacterias BL21 (DE3) con el plásmido fueron cultivadas en 4ml de LB-Broth suplementados con ampicilina a una concentración final de 100µg/ml e incubadas toda la noche a 37°C con una agitación de 220 rpm.

- 5
- Al día siguiente, se realizó la inducción de la expresión de la proteína. Para ello, el cultivo del día anterior fue diluido 1/10 en un volumen final de 50 ml de medio LB-Broth suplementado con ampicilina e incubado a 37°C con una agitación de 220 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) de 0.80-1 nm. Llegado este momento se añadió el inductor IPTG a una concentración final de 0.5mM (previamente establecida) y el cultivo fue incubado durante 4 horas a 37°C con una agitación de 220 rpm. A partir de este momento
- 10
- comenzó el proceso de transcripción para la expresión de la proteína. Transcurridas las 4 horas de inducción (optimizada previamente) se recogió el cultivo y se centrifugó a 1600g a 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet guardado a -80°C hasta su posterior uso.

Extracción de la proteína recombinante

- 15
- La proteína recombinante expresada se localizaba en el interior de la bacteria. Para acceder a ella y poder purificarla se debía romper la pared bacteriana mediante procesos físicos y químicos que a continuación se detallan:

- El precipitado de bacterias almacenado a -80°C fue descongelado a temperatura ambiente. Seguidamente, se le añadieron 0.5ml de tampón de lisis bacteriana por cada mililitro de cultivo inicial y se resuspendió on la ayuda de una pipeta. La suspensión resultante fue incubada durante 1 hora a temperatura ambiente en rotación. Transcurrido este
- 20
- tiempo la muestra fue sometida a ultrasonidos en ciclos de 5 pulsos de 30 segundos en hielo, y con una intensidad del 40%. A continuación fue ultracentrifugada a 15000 g durante 20 minutos a 4°C y con ello se separaron las membranas de las proteínas liberadas de la bacteria. Tras la ultracentrifugación se recogió el sobrenadante y se pasó a través de un filtro de 0.45 µm.

Purificación de la proteína recombinante IFNAR2.3

- 25
- El producto obtenido tras la extracción contenía la proteína recombinante junto con otras proteínas bacterianas. Para purificar y aislar la proteína recombinante IFNAR2.3, se utilizó la técnica de cromatografía de afinidad, de forma que la proteína recombinante IFNAR2.3 queda retenida por la cola de histidina-asparagina que contiene. Las columnas elegidas se presentan en un volumen de 1 ml y están llenas de resina de sefarsa que llevan unidas iones de níquel. Los iones de níquel le confieren la capacidad de retener proteínas ricas en histidina y
- 30
- por tanto la proteína recombinante IFNAR2.3 va a quedar retenida, entre otras. La liberación de la proteína de la resina se produce por la adición de un tampón rico en imidazol que compite con el sitio de unión al níquel. A continuación se detalla el protocolo seguido:

- Antes de iniciar el proceso de purificación con la cromatografía de afinidad, la resina fue lavada y equilibrada con 10 ml de tampón de equilibrado. Seguidamente, el extracto proteico que contiene nuestra proteína de interés, fue
- 35
- puesto en contacto con la resina en rotación a 4°C durante 1 hora y posteriormente, la resina fue empaquetada en la columna. Para eliminar las proteínas no unidas a la resina, ésta se lavó con 10ml de tampón de equilibrado. Finalmente, las proteínas retenidas por el níquel fueron eluidas con 5 ml de tampón de elución rico en imidazol y recogidas en alícuotas de 1 ml.

Detección de la proteína recombinante: Electroforesis y Western blot

- 40
- El primer paso para la detección de la proteína fue la realización de la electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente la transferencia de las proteínas a una membrana. El protocolo seguido fue:

- Las muestras fueron resuspendidas en tampón de carga 5x y hervidas a 100°C durante 3 minutos en un termobloque. A continuación, éstas fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 12%, sumergidas en tampón de electroforesis y sometidas a una corriente constante de 130 V. Una vez finalizada la electroforesis, el gel obtenido fue sumergido en tampón de transferencia durante unos minutos.

- 45
- La transferencia se realizó en un sistema semi-seco en planchas de grafito que previamente habían sido humedecidas con agua. A continuación la membrana de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0.45 µm fue activada sumergiéndola en agua y posteriormente equilibrada en tampón de transferencia. Posteriormente, se procedió a montar el sándwich; sobre la plancha de grafito; se dispusieron 9 papeles de transferencia previamente humedecidos en tampón de transferencia, a continuación la membrana encima y sobre ésta el gel que iba a ser
- 50
- transferido. Para terminar con el sándwich, se volvieron a poner 9 papeles de transferencia humedecidos en tampón de transferencia. La transferencia se realizó durante 45 minutos con una intensidad de 0.8 mA/cm².

- Una vez terminada la transferencia, la membrana fue separada y bloqueada con tampón de bloqueo durante 2h a temperatura ambiente y con agitación. El bloqueo es una etapa que evita la unión no específica de los anticuerpos a los sitios libres de la membrana, quedando éstos bloqueados con la caseína de la leche. Tras el bloqueo, la
- 55
- membrana fue puesta en contacto con el anticuerpo primario anti-IFNAR2 Human producido en conejo (Abnova)

1/5000, previamente establecida la dilución, en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C en rotación. Al día siguiente, la membrana fue retirada de la solución con anticuerpo y lavada con tampón de lavado. La membrana fue incubada durante una hora y media con el anticuerpo anti-IgG de conejo (Sigma-Aldrich) marcado con fosfatasa alcalina, a una dilución 1/10000 en solución de bloqueo. Se procedió a lavar como en el punto anterior. Para ver el resultado del western blot, se reveló la membrana poniéndola en contacto con una mezcla formada por 200 µl de NBT/BCIP + 10ml de solución de revelado a temperatura ambiente hasta la aparición un producto coloreado. Para finalizar, la reacción fue parada desechando la solución de revelado y sumergiéndola en solución de parada, rica en iones magnesio que bloquean el desarrollo de la reacción colorimétrica retirando el NBT/BCIP.

Tras la purificación de la proteína, se hicieron los ensayos de puesta a punto de la técnica de ELISA tal y como se detalla a continuación.

Técnica de ELISA para cuantificación del fragmento soluble IFNAR2.3

Podemos considerar la técnica de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) como una de las herramientas más poderosas para la detección y cuantificación de proteínas específicas en una mezcla compleja de ellas. Originalmente descrito por Engvall y Perlmann en 1971 (Engvall & Perlmann *Immunochemistry*. 1971 Sep;8(9):871-4) como una alternativa más sencilla e igualmente sensible a la metodología de detección de sustancias por RIA (*Radioimmuno assay*).

Se ha puesto a punto un ELISA tipo sándwich que requiere dos anticuerpos diferentes que se unen al mismo antígeno. El primer anticuerpo (unido a la placa) es el llamado anticuerpo primario, mientras que el segundo anticuerpo detecta el antígeno inmovilizado por el primero y se denomina anticuerpo de secundario) Dado que este último no está marcado, hemos recurrido a un tercer anticuerpo (especie-específico) conjugado a una enzima a la que posteriormente enfrentaremos con su sustrato que dará lugar a una reacción colorimétrica.

Se sensibiliza la placa con un anticuerpo específico que reconocerá e inmovilizará nuestro antígeno objeto de estudio (IFNAR2.3). En este estudio hemos optimizado la concentración de anticuerpo primario en combinación con la concentración de anticuerpo secundario para incrementar la relación entre señal/ruido de fondo. Para esto, hemos realizado la sensibilización de las placas con tres diferentes concentraciones de anticuerpo de primario (0.8, 1 y 1.2 µg/ml) en tampón carbonato/bicarbonato a pH 9.6 e incubado 16 horas a 4°C. Posteriormente se procede a la retirada del anticuerpo de primario y el lavado de la placa tres veces con tampón de lavado TBS/Tween (TBS, 1.5mM MgCl₂, 0.05% Tween 20)

En todos los experimentos se bloqueó la unión no específica por medio de la adición de una solución de bloqueo (TBS/Tween/1% BSA), incubando durante 1 hora a 37 °C, tras lo cual procedemos a realizar de nuevo tres lavados con TBS-Tween.

Para optimizar la concentración de anticuerpo de detección, la placa se sensibilizó con el anticuerpo primario como acabamos de describir. Como antígeno (y control positivo de la técnica) se empleó la proteína recombinante IFNAR2.3 producida en bacterias y purificada por medio de cromatografía de afinidad. Se utilizaron distintas diluciones de la proteína recombinante IFNAR2.3 (1/20, 1/50, 1/100 y 1/200); además se incluyó un control negativo en cada placa que consistió en solución de bloqueo (TBS/Tween 20/1% BSA). Las muestras se incubaron a 37°C durante 1 hora, tras lo cual se procedió a lavar la placa tres veces con tampón TBS/Tween. Tras este paso se añadió el anticuerpo secundario a distintas concentraciones (400, 600 y 800 ng/ml en solución de bloqueo) y se incubó de nuevo durante 1 hora a 37°C, procediendo de nuevo al lavado de la placa 3 veces con tampón TBS/Tween. Posteriormente, se recurrió a la incubación con un anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina, siguiendo las especificaciones del proveedor, que detecta específicamente la IgG de ratón y se incubó de nuevo durante 1 hora a 37°C, lavando la placa tras la incubación con TBS/Tween. Finalizado este proceso se añadió a cada pozo de la placa la solución sustrato de fosfatasa alcalina. Tras incubar la placa durante 30 min a 37°C se detuvo la reacción con 3 M NaOH. Como fruto de la reacción enzima-sustrato, los pozos en los que hay una identificación del antígeno aparecen amarillo brillante. La intensidad del color se cuantificó por la lectura de la densidad óptica de cada pocillo a 405 nM en un lector de placas.

El resultado obtenido en este tipo de experimentos permitió fijar la concentración óptima de anticuerpo de primario y secundario para mantener la mejor relación entre señal y ruido de fondo (figuras), eligiendo como mejor condición, la sensibilización de la placa con 0.8 µg/ml de anticuerpo de primario y 400 ng/ml de anticuerpo secundario.

Ensayo en pacientes

Una vez optimizada la técnica se ha determinado la presencia de IFNAR2.3 en suero de pacientes de EM y de controles sanos.

		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	Sin tratar	81	60,4
	CONTROLES	53	39,6
	Total	134	100,0

A continuación se presenta una tabla (Tabla 3) como ejemplo de las absorbancias obtenidas:

5

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,999	0,876	0,813	0,812	0,709	0,722	0,928	0,939	0,862	0,835	0,743	0,778
B	0,747	0,665	0,672	0,733	0,787	0,768	0,8	0,776	0,686	0,702	0,995	1,056
C	0,882	0,85	0,841	0,829	0,729	0,735	1,032	0,845	0,706	0,759	1,045	1,012
D	0,711	0,721	0,701	0,7	0,915	0,906	0,6	0,618	0,726	0,966	0,96	0,983
E	0,89	0,832	0,925	0,877	0,897	0,866	0,709	0,676	0,843	0,949	0,917	0,892
F	0,872	0,814	0,839	0,825	1,106	1,118	0,639	0,661	0,767	0,776	0,764	0,75
G	0,941	0,954	0,839	0,86	0,933	0,94	0,758	0,743	0,984	1,014	0,842	0,827
H	0,967	0,972	0,874	0,89	0,808	0,817	0,88	0,919	4,000	3,909	0,208	0,205

10

Se ha calculado la variación intraensayo de la técnica, determinando la DO la misma muestra en el mismo ensayo 12 veces y se ha obtenido un coeficiente de variación de 12,2%. Para el cálculo de la variación interensayo se determinó la DO de la misma muestra en 7 ensayos diferentes realizados en diferentes días, obteniéndose un coeficiente de variación de 17,1%.

Todas las muestras han sido analizadas por duplicado. En el caso que el porcentaje del coeficiente de variación entre las dúplicas exceda el 25%, la determinación para esa muestra es considerada como no válida.

Análisis estadístico de los datos

15

Los datos obtenidos en los diferentes experimentos se normalizaron para obtener el "índice de muestra" como se describe en el apartado siguiente y sobre ellos se aplicaron test no paramétricos para muestras independientes. La expresión de IFNAR2.3 en suero muestra diferencias significativas en pacientes tratados con IFN, pacientes de EM sin tratamiento y controles sanos, tal y como se observa en la Fig. 8.

20

Según los datos, el tratamiento con IFN β aumenta los niveles séricos de IFNAR2.3 respecto a pacientes no tratados y controles sanos. Las diferencias encontradas entre pacientes no tratados y controles sanos, sin intervenir el tratamiento con IFN β , son probablemente debidas a la patogenia de la enfermedad.

25

Para comprobar que las diferencias encontradas no se deben exclusivamente al tratamiento con IFN β , se han incluido pacientes tratados con Copaxone®. No se han encontrado diferencias significativas entre los pacientes tratados con Copaxone® y los pacientes sin tratamiento (presentan medianas muy similares) y se mantienen las diferencias entre los tratados con Copaxone® y los controles sanos.

Análisis de la sensibilidad y especificidad del ELISA

30

Para normalizar y homogeneizar los datos crudos de absorbancias obtenidos en el ELISA para la determinación de IFNAR2.3 en suero, se estableció un punto de corte a partir del control negativo obtenido en cada placa, mediante los siguientes cálculos:

Cut off: $3(\text{DO NEG} + \text{Desv. St neg})$; Cut off: $3(0.089 + 0.0136) = 0.307$

Las absorbancias de los sueros fue dividido entre el cut off. A este nuevo valor resultante, se le denominó "INDICE DE LA MUESTRA" con la cual realizaríamos todos los análisis estadísticos.

- 5 **SENSIBILIDAD:** Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo que se ha definido como positivo respecto a la condición que estudia la prueba. Probabilidad de que un sujeto enfermo obtenga en la prueba un resultado positivo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad del test para detectar la enfermedad.

En este ensayo se ha definido como positivo ser paciente.

$$S = \frac{VP}{(VP + FN)} * 100$$

- 10 **ESPECIFICIDAD:** Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo que se ha definido como negativo. Probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que un sujeto sano obtenga un resultado negativo. Es igual a restar a 1 la fracción de falsos positivos.

En nuestro caso se ha definido como negativo ser control.

$$E = \frac{VN}{(VN + FP)} * 100$$

- 15 Con el índice de muestra se ha establecido de forma arbitraria diferentes puntos de corte. Se ha creado una variable nueva para cada punto de corte, clasificando las muestras como:

- verdaderos positivos (pacientes por encima del punto de corte)
- falsos positivos (control por encima del punto de corte),
- verdaderos negativos (control por debajo del punto de corte)
- falsos negativos (pacientes por debajo del punto de corte).

20 **Análisis de pacientes tratados, no tratados y controles sanos**

En este primer análisis se incluyen pacientes de EM (sin tratamiento, tratados con IFN y tratados con Copaxone®) y controles sanos (Fig. IX)

- 25 Este análisis no sirve para discriminar entre controles sanos y pacientes, porque dentro del grupo de pacientes de EM se incluyen los pacientes tratados con IFN y previamente se ha visto que el tratamiento con IFN incrementa los niveles de IFNAR2.3, por lo que es necesario excluir a los pacientes tratados con IFN del análisis.

Análisis de pacientes sin tratamiento - Controles sanos

Para establecer si el test permite discriminar entre pacientes de EM y controles sanos, se han excluido del análisis los pacientes con tratamiento.(Fig. 10)

- 30 A continuación, se muestran las sensibilidades y especificidades para distintos puntos de corte, según las siguientes fórmulas

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{(VP + FN)} * 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{(VN + FP)} * 100$$

Tabla X. positivo=paciente; negativo= control; punto de corte 1.45

		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	verdadero negativo	30	22,4
	verdadero positivo	74	55,2
	falso negativo	8	6,0
	falso positivo	22	16,4
	Total	134	100,0

Sensibilidad= 90%

- 35 Especificidad= 57%

Tabla X. positivo=paciente; negativo= control; punto de corte 1.50

		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	verdadero negativo	36	26,9
	verdadero positivo	67	50,0
	falso negativo	14	10,4
	falso positivo	17	12,7
	Total	134	100,0

Sensibilidad = 82.7%

Especificidad = 67.9%

5 positivo=paciente; negativo= control; punto de corte 1.55

		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	verdadero negativo	36	26,9
	verdadero positivo	65	48,5
	falso negativo	17	12,7
	falso positivo	16	11,9
	Total	134	100,0

Sensibilidad= 79.2%

Especificidad = 69.0%

positivo=paciente; negativo= control; punto de corte 1.70

		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	verdadero negativo	39	29,1
	verdadero positivo	49	36,6
	falso negativo	33	24,6
	falso positivo	13	9,7
	Total	134	100,0

Sensibilidad= 59.7%

Especificidad = 75%

10

Resumen de los resultados

Teniendo en cuenta los grupos de los pacientes sin tratamiento y los controles sanos.

Tabla resumen de frecuencias

		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	Sin tratar	81	60,4
	CONTROLES	53	39,6
	Total	134	100,0

5

TABLA RESUMEN Sensibilidad y especificidad de la variable índice de la muestra (ELISA) con distintos puntos de corte establecidos (pacientes sin tratamiento y controles sanos)

Punto de corte (Test positivo)	Sensibilidad (tasa de aciertos con los enfermos)	Especificidad (tasa de aciertos con los controles)	
>1.24	100%	25%	Se clasifican bien los pacientes
>1.45	90.0%	57.0%	
>1.50	82.7%	68.0%	
>1.55	79.2%	69.0%	
>1.70	59.7%	75.0%	
<2.14	24%	100%	Se clasifican bien los controles

10 **TABLA RESUMEN: Valores predictivos positivo y negativo de la variable índice de la muestra (ELISA) con distintos puntos de corte establecidos**

Valor predictivo positivo: VP/VP+FP

Valor predictivo negativo: VN/FN+VN

Punto de corte (Test positivo)	Valor predictivo positivo*	Valor predictivo negativo*	
<1.24		100%	Detecta a todos los controles
<1.45	77.0%	79.0%	
<1.50	79.7%	72.0%	
<1.55	80.0%	68.0%	
<1.70	79.0%	54.0%	
>2.14	100%		Detecta a todos los pacientes

* Valores sujetos a la prevalencia obtenida en consulta.

Estaríamos ante un indicador (univariante) que sin otro tipo de información multivariante presenta buena capacidad discriminante entre pacientes de EM y controles sanos.

REIVINDICACIONES

- 1.- Una proteína recombinante obtenible por un procedimiento que comprende:
 - a) integrar un inserto con la secuencia nucleotídica SEQ ID NO. 1 en un vector de expresión,
 - 5 b) transformar un hospedador con el vector de expresión del paso (a),
 - c) inducir la expresión de la proteína recombinante,
 - d) extraer la proteína recombinante, y
 - e) purificar la proteína recombinante.
- 10 2.- La proteína recombinante según la reivindicación anterior, donde el vector de expresión es el vector prelinearizado pEcoli-Cterm 6xHN Linear.
- 3.- La proteína recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el hospedador del paso (b) son bacterias de expresión.
- 4.- La proteína recombinante según la reivindicación anterior, donde las bacterias de expresión son bacterias *E. coli* BL21(DE3).
- 15 5.- La proteína recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la integración del paso (a) se realiza mediante un proceso de ligación.
- 6.- La proteína recombinante según la reivindicación anterior, donde en la ligación se emplea un liofilizado que comprende la enzima In-Fusion.
- 20 7.- La proteína recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el inserto se sintetizó empleando los cebadores de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.
- 8.- Un anticuerpo, o un fragmento del mismo, que reconoce específicamente una proteína recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 9.- El anticuerpo o un fragmento del mismo, según la reivindicación anterior, obtenible por inyección de la proteína recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en un animal apropiado, y recogida y purificación de los antisueros de los animales.
- 25 10.- El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, que es un anticuerpo monoclonal.
- 11.- Una composición que comprende:
 - a) una proteína que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2,
 - b) la proteína recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o
 - 30 c) el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 8-10.
- 12.- La composición según la reivindicación anterior, que es una composición farmacéutica.
- 13.- El uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 11-12, en la elaboración de un medicamento.
- 35 14.- El uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 11-12, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la esclerosis múltiple.
- 15.- Un método de obtención de datos útiles, para el diagnóstico de individuos con esclerosis múltiple, que comprende:
 - a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y
 - b) detectar el producto de expresión de *IFNAR2.3*
- 40 16.- Un método de obtención de datos útiles según la reivindicación anterior, que además comprende:
 - c) comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia.
- 17.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 15-16, donde los pasos (b) y/o (c) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados.

- 18.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 15-17, donde la muestra biológica es suero.
- 19.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 15-18, donde la cuantificación se hace mediante un inmunoensayo.
- 20.- El método según la reivindicación 19, donde el inmunoensayo es un ELISA.
- 5 21.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 19-20, donde el inmunoensayo es un ELISA sándwich.
- 22.- Un método de diagnóstico, pronóstico y clasificación de individuos que comprende los pasos (a)-(c) según cualquiera de las reivindicaciones 15-21, y que además comprende asignar al individuo del paso (a) al grupo de individuos con esclerosis múltiple cuando presentan un valor superior a 2,14 por encima del punto de corte establecido en la curva ROC.
- 10 23 . Un método de diagnóstico, pronóstico y clasificación de individuos que comprende los pasos (a)-(c) según cualquiera de las reivindicaciones 15-21, y que además comprende asignar al individuo del paso (a) al grupo de individuos sin esclerosis múltiple cuando presentan un valor inferior a 1,14 por debajo del punto de corte establecido en la curva ROC.
- 15 24.- Un kit o dispositivo, que comprende los elementos necesarios para cuantificar el producto de expresión de *IFNAR2.3*.
- 25.- El kit o dispositivo según la reivindicación anterior, que comprende un anticuerpo según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 8-10.
- 26.- Un kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 24-25, que comprende una proteína recombinante según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 20 27.- Un kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 24-26, que además comprende:
- a) un soporte sólido que lleva unido un anticuerpo primario
 - b) anticuerpo secundario
 - c) una solución del anticuerpo de detección, marcado con un marcador enzimático; y
 - d) un reactivo.
- 25 28.- Un kit o dispositivo según la reivindicación anterior, donde el anticuerpo primario comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3.
- 29.- Un kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 27-28, donde el anticuerpo secundario comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4.
- 30 30.- El uso de un kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 29, para llevar a cabo un método según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 15 -23.
- 31.- Un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos del método según cualquiera de las reivindicaciones 15 -23.
- 32.- Una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos del método según cualquiera de las reivindicaciones 15 -23.

35

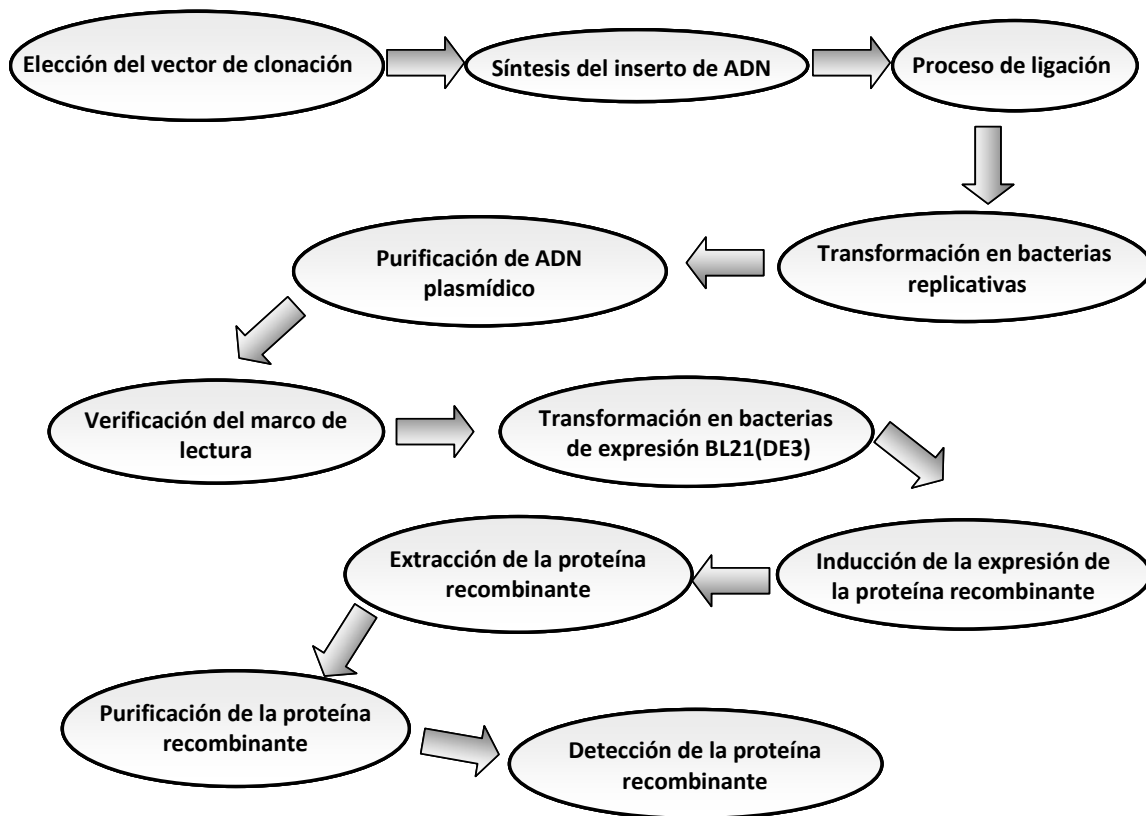


Fig. 1

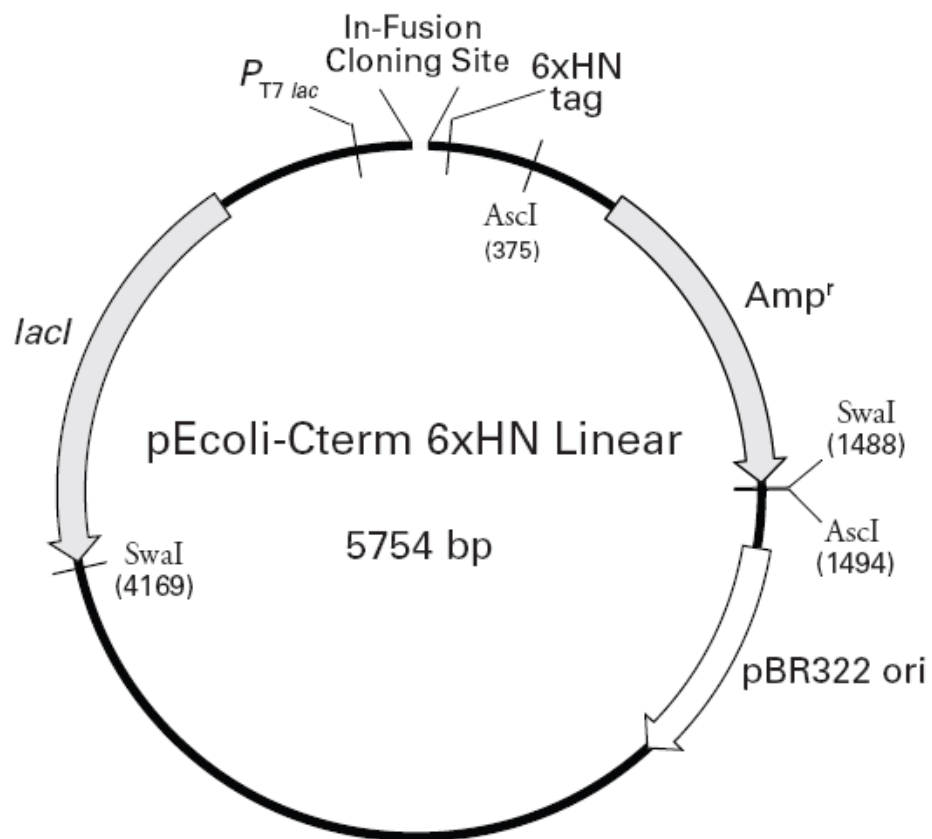


Fig. 2

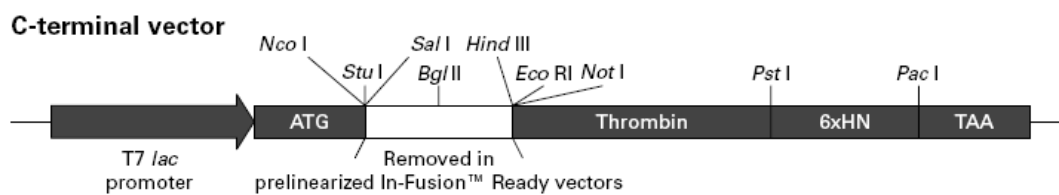


Fig. 3

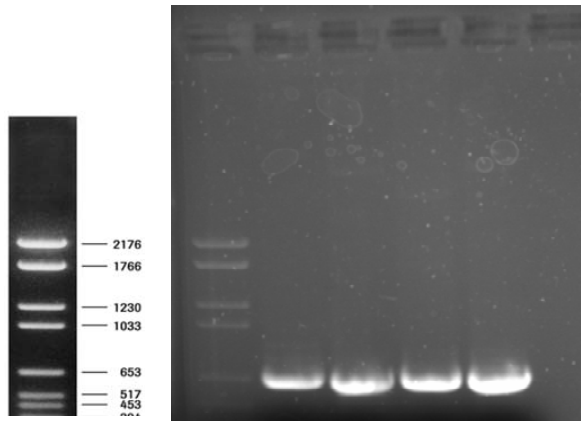


Fig. 4

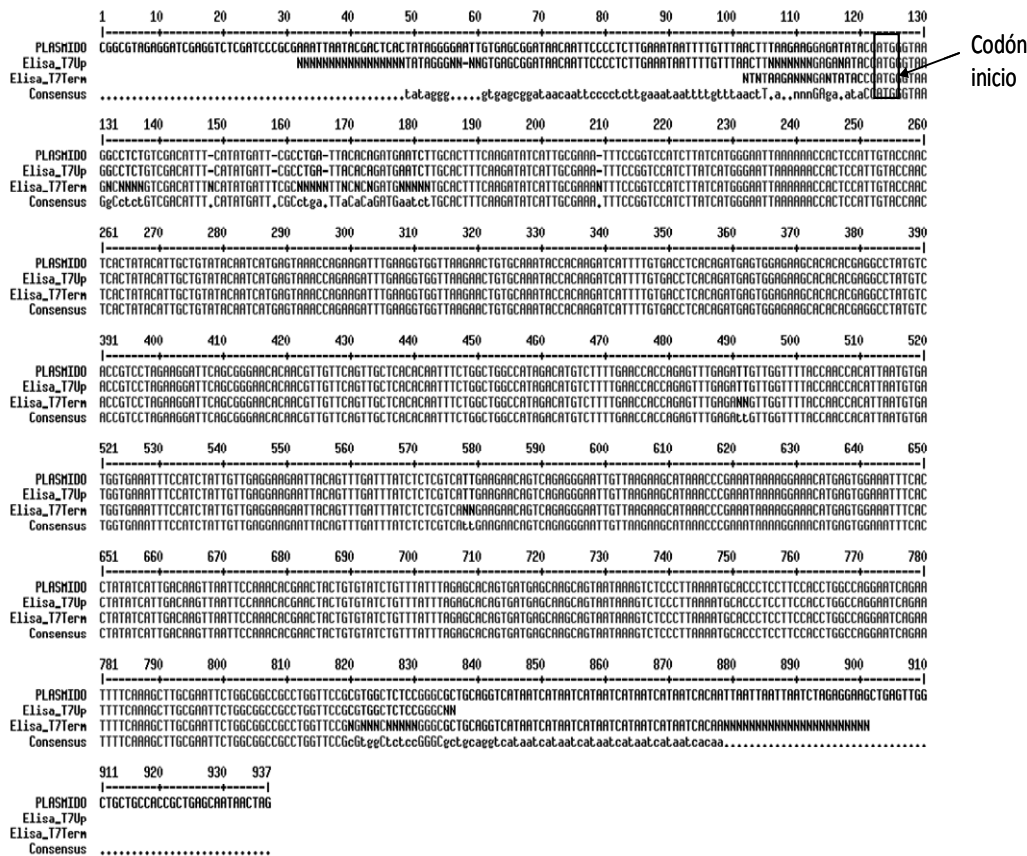


Fig. 5

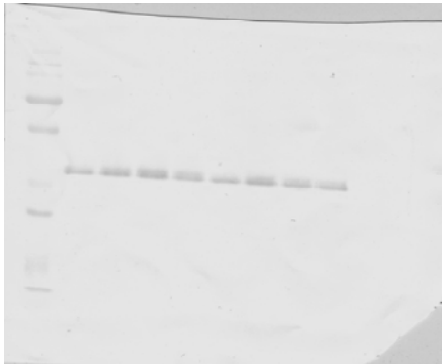


Fig. 6

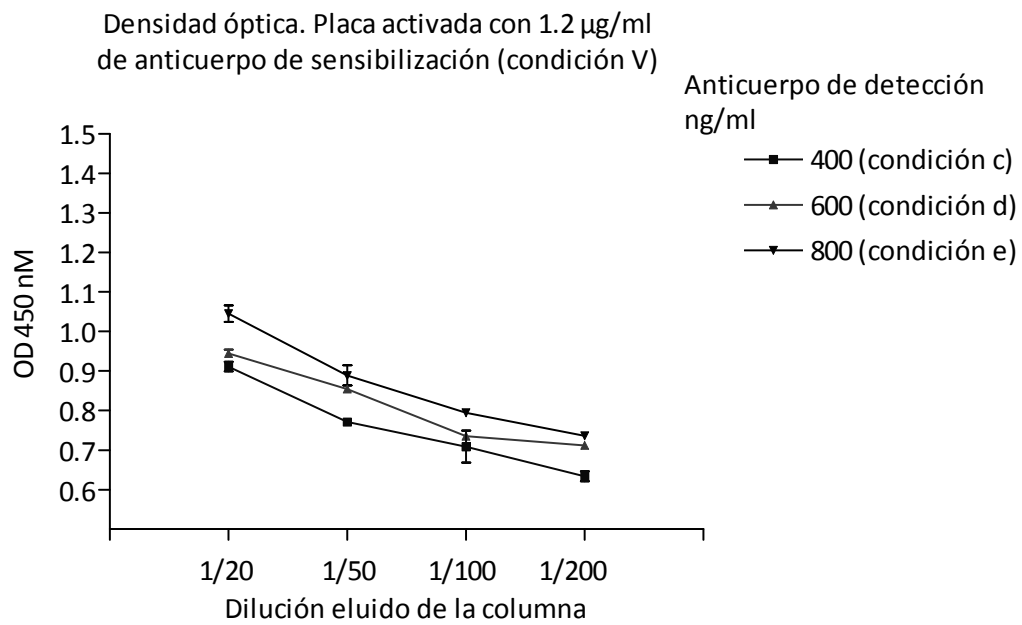


Fig. 7(A)

Densidad óptica. Placa activada con 1 µg/ml de anticuerpo de sensibilización (condición IV)

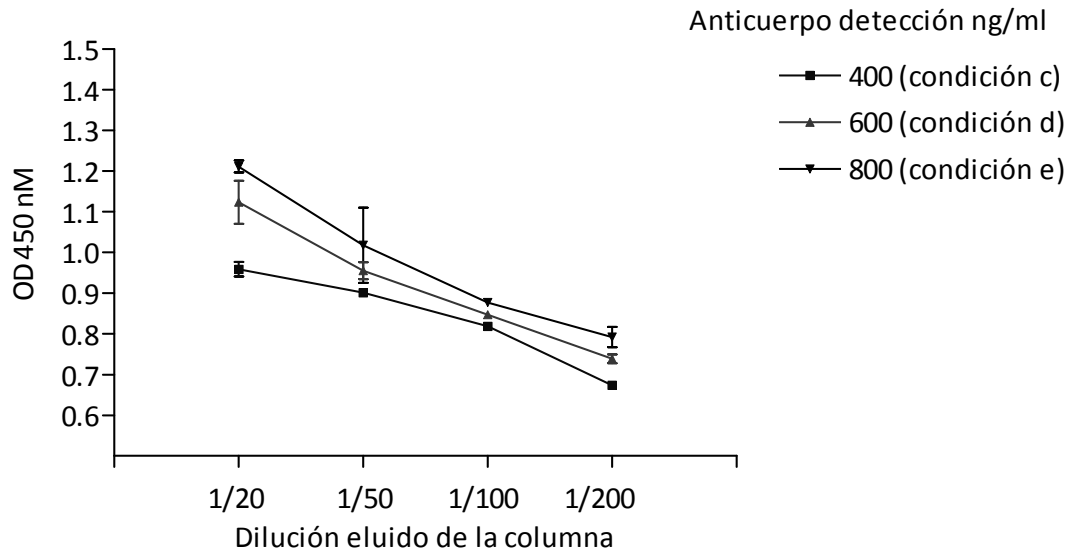


Fig. 7(B)

Densidad óptica. Placa activada con 0.8 µg/ml de anticuerpo de sensibilización (condición III)

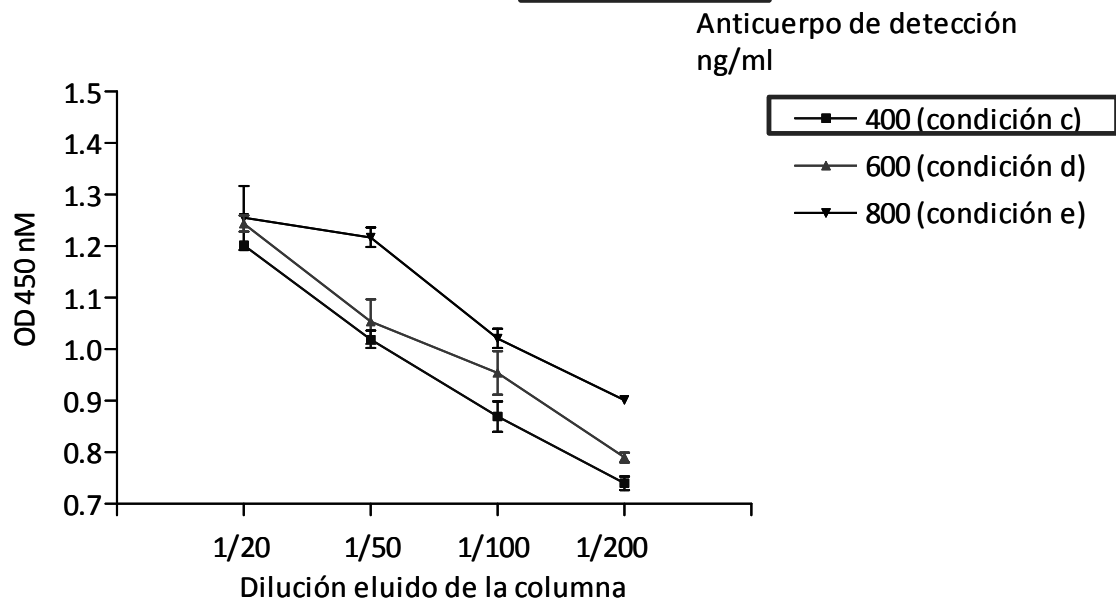


Fig. 7(C)

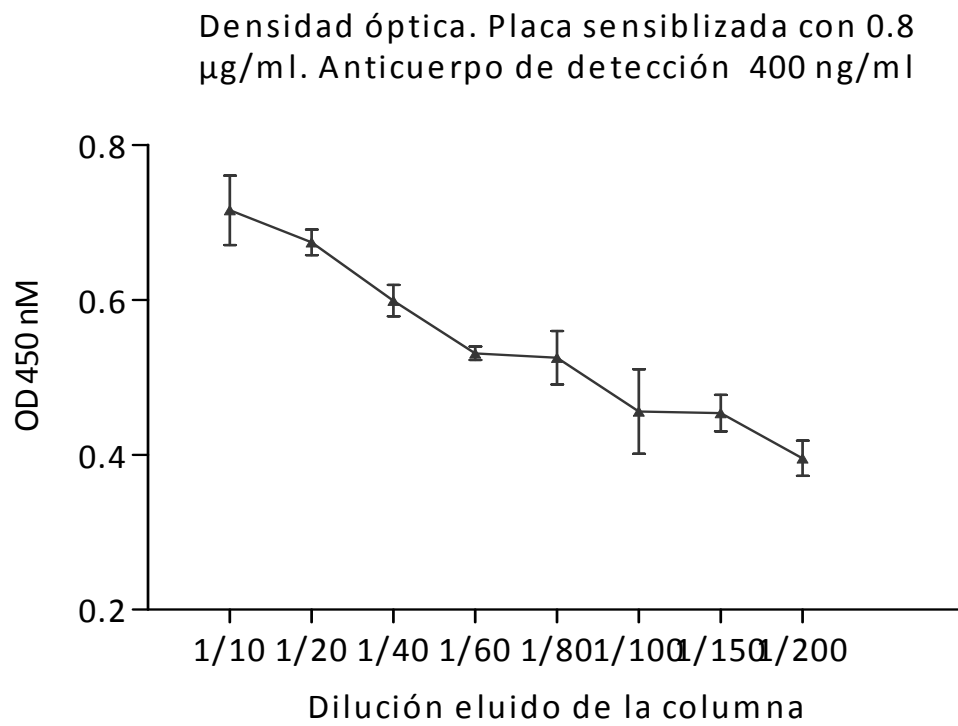


Fig. 7(D)

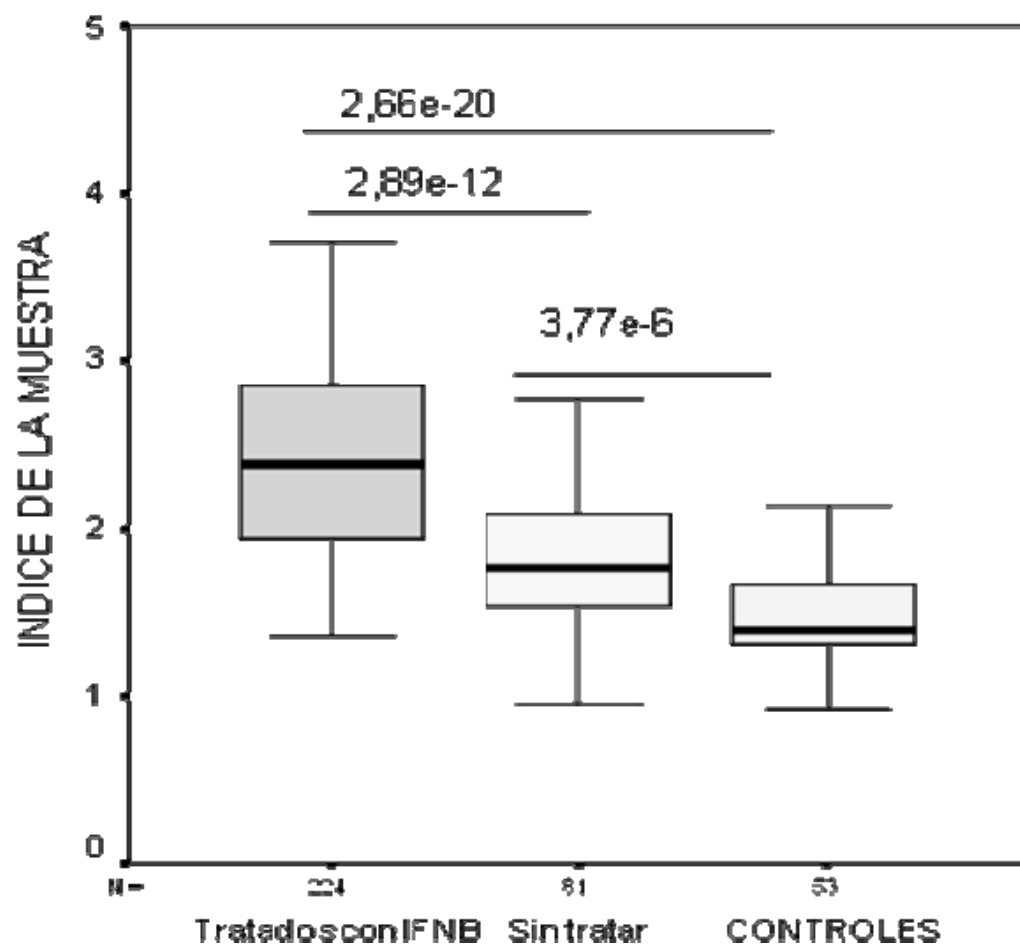


Fig. 8

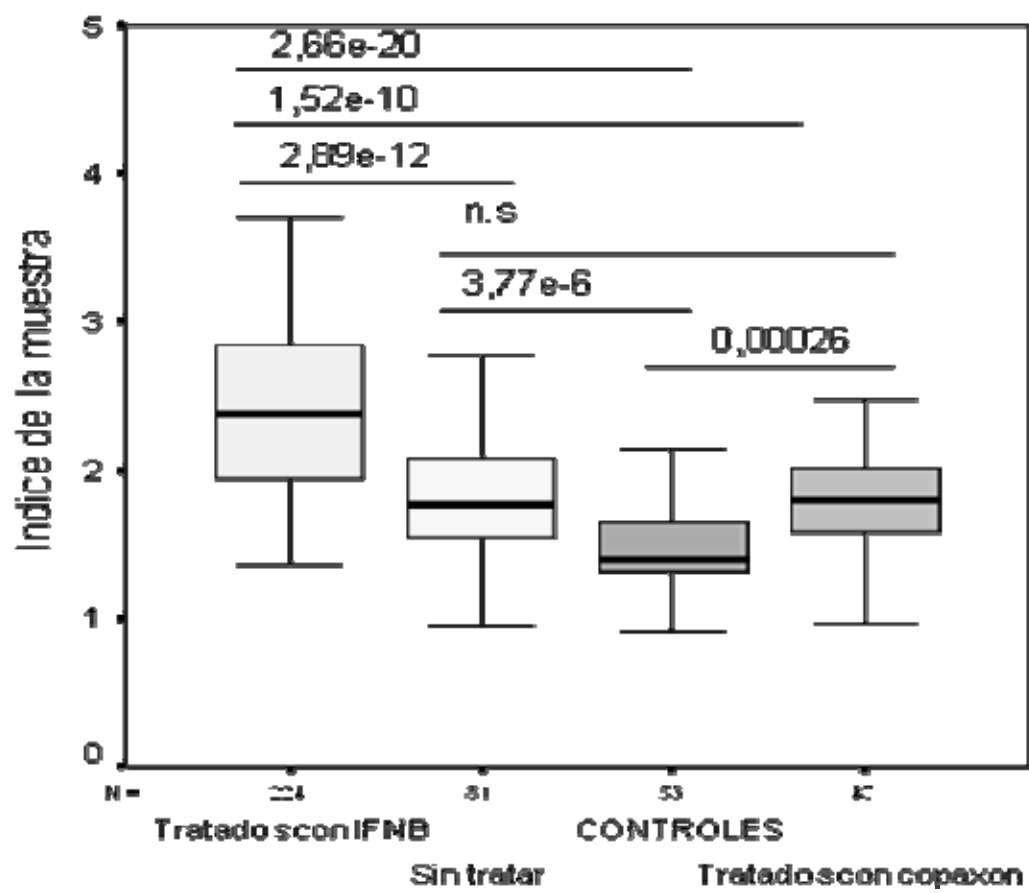


Fig. 9

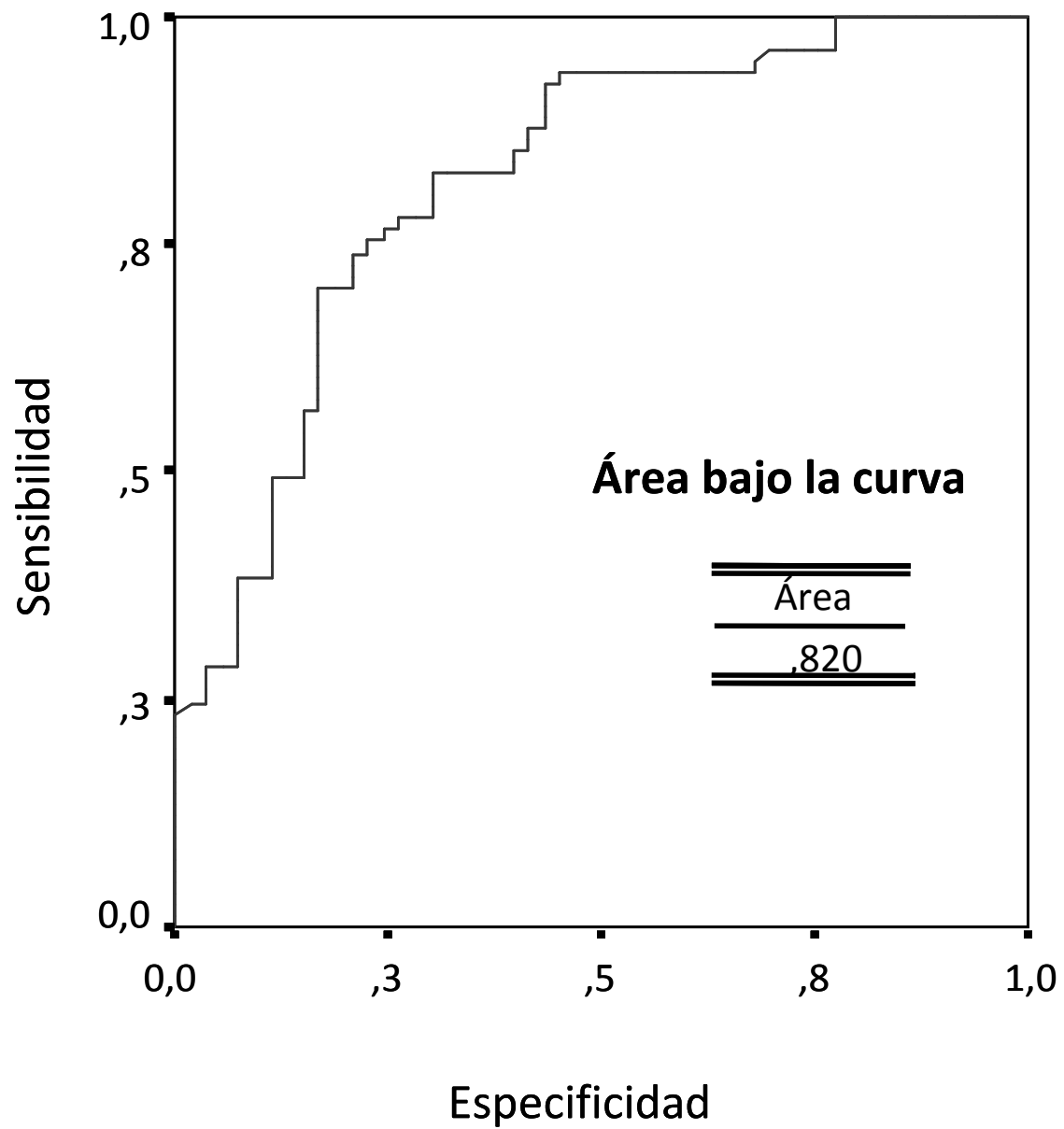


Fig. 10

IMABIS-80_ST25-2
SEQUENCE LISTING

<110> SERVICIO ANDALUZ DE SALUD
FIMABIS
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

<120> Proteína recombinante y usos en el diagnóstico de la esclerosis múltiple

<130> IMABIS-80

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 2479
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> secuencia nucleotídica que codifica para IFNAR2.3

<400> 1
agatgtaaaa gtcaagagaa gactctaaaa atagcaaaga tgcttttgag ccagaatgcc 60
ttcatcttca gataccttaa ttgggttctc atgggtgtata tcagcctcgt gtttggtatt 120
tcatatgatt cgcttgatta cacagatgaa tcttgcaactt tcaagatatt attgcgaaat 180
ttccgggtcca tcttatcatg ggaattaaaa aaccactcca ttgtaccaac tcactataca 240
ttgtgtata caatcatgag taaaccagaa gatttgaagg tggtaagaa ctgtgcaaat 300
accacaagat ctttttgtga cctcacagat gaggggagaa gcacacacga ggcttatgtc 360
accgtcctag aaggattcag cgggaacaca acgttgttca gttgctcaca caatttctgg 420
ctggccatag acatgtcttt tgaaccacca gagtttgaga ttgttggttt taccaaccac 480
attaatgtga tgggtgaaatt tccatctatt gttgaggaag aattacagtt tgatttatct 540
ctcgtcattg aagaacagtc agaggggaatt gttaagaagc ataaccgccg aataaaagga 600
aacatgagtg gaaatttcac ctatatcatt gacaagttaa ttccaaacac gaactactgt 660
gtatctgttt atttagagca cagtgatgag caagcagtaa taaagtctcc cttaaaatgc 720
accctccttc cacctggcca ggaatcagaa ttttcataac tttttagcct ggccatttcc 780
taacctgcca ccgttggaag ccatggatat ggtggaggtc atttacatca acagaaagaa 840
gaaagtgtgg gattataatt atgatgatga aagtgatagc gatactgagg cagcgccag 900
gacaagtggc ggtggctata ccatgcatgg actgactgtc aggcctctgg gtcaggcctc 960
tgccacctct acagaatccc agttgataga cccggagtcc gaggaggagc ctgacctgcc 1020
tgaggttgat gtggagctcc ccacgatgcc aaaggacagc cctcagcagt tggaaactctt 1080
gagtgggccc tgtgagagga gaaagagtcc actccaggac ccttttcccg aaggaggacta 1140
cagctccacg gaggggtctg ggggcagaat taccttcaat gtggacttaa actctgtgtt 1200
tttgagagtt cttgatgacg aggacagtga cgacttagaa gcccctctga tgctatcgtc 1260
tcatctggaa gagatggttg acccagagga tcctgataat gtgcaatcaa accatttgct 1320
ggccagcggg gaagggacac agccaacctt tcccagcccc tcttcagagg gcctgtggtc 1380

IMABIS-80_ST25-2

cgaagatgct ccatctgac aaagtgacac ttctgagtca gatgttgacc ttggggatgg 1440
 ttatataatg agatgactcc aaaactattg aatgaacttg gacagacaag cacctacagg 1500
 gttctttgtc tctgcatcct aacttgctgc cttatcgtct gcaagtgttc tccaagggaa 1560
 ggaggaggaa actgtggtgt tcctttcttc caggtgacat cacctatgca cattcccagt 1620
 atggggacca tagtatcatt cagtgcattg ttacatatt caaagtgggtg cactttgaag 1680
 gaagcacatg tgcaccttcc ctttacta atgcacttag gatgtttctg catcatgtct 1740
 accagggagc aggggttccc acagtttcag aggtgggtcca ggaccctatg atatttctct 1800
 tctttcgttc tttttttttt ttttttgaga cagagtctcg ttctgtcgcc caagctggag 1860
 cgcaatggtg tgatcttggc tctctgcaac atccgcctcc cgggttcagg tgattctcct 1920
 gcctcagcct cctctgcaag tagctgggat tacaggcgcc tgccaccatg cctagcaaat 1980
 ttttgatatt ttagtggaga caggatttta ccatgttggc caggctgggtc tcgaactcct 2040
 gacctcaagt gatctgccct cctcagcctc gtaaagtgtc gggattacag ggtgagccg 2100
 ctgtgcctgg ctggccctgt gatatttctg tgaaataaat tgggccaggg tgggagcagg 2160
 gaaagaaaag gaaaatagta gcaagagctg caaagcaggc aggaagggag gaggagagcc 2220
 aggtgagcag tggagagaag gggggccctg cacaaggaaa cagggaagag ccatcgaagt 2280
 ttcagtcggt gagccttggg cacctcacc atgtcacatc ctgtctcctg caattggaat 2340
 tccaccttgt ccagccctcc ccagttaaag tggggaagac agactttagg atcacgtgtg 2400
 tgactaatac agaaaggaaa catggcgctg gggagaggga taaaacctga atgcatatt 2460
 ttaagttaaa aaaaaaaaaa 2479

<210> 2
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> secuencia aminoacidica IFNAR2.3
 <400> 2

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

ES 2 470 816 A1

IMABIS-80_ST25-2

Val Val Lys Asn Cys Ala Asn Thr Thr Arg Ser Phe Cys Asp Leu Thr
85 90 95

Asp Glu Trp Arg Ser Thr His Glu Ala Tyr Val Thr Val Leu Glu Gly
100 105 110

Phe Ser Gly Asn Thr Thr Leu Phe Ser Cys Ser His Asn Phe Trp Leu
115 120 125

Ala Ile Asp Met Ser Phe Glu Pro Pro Glu Phe Glu Ile Val Gly Phe
130 135 140

Thr Asn His Ile Asn Val Met Val Lys Phe Pro Ser Ile Val Glu Glu
145 150 155 160

Glu Leu Gln Phe Asp Leu Ser Leu Val Ile Glu Glu Gln Ser Glu Gly
165 170 175

Ile Val Lys Lys His Lys Pro Glu Ile Lys Gly Asn Met Ser Gly Asn
180 185 190

Phe Thr Tyr Ile Ile Asp Lys Leu Ile Pro Asn Thr Asn Tyr Cys Val
195 200 205

Ser Val Tyr Leu Glu His Ser Asp Glu Gln Ala Val Ile Lys Ser Pro
210 215 220

Leu Lys Cys Thr Leu Leu Pro Pro Gly Gln Glu Ser Glu Phe Ser
225 230 235

<210> 3
<211> 331
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Secuencia aminoacídica del anticuerpo de captura

<400> 3

Met Leu Leu Ser Gln Asn Ala Phe Ile Val Arg Ser Leu Asn Leu Val
1 5 10 15

Leu Met Val Tyr Ile Ser Leu Val Phe Gly Ile Ser Tyr Asp Ser Pro
20 25 30

Asp Tyr Thr Asp Glu Ser Cys Thr Phe Lys Ile Ser Leu Arg Asn Phe
35 40 45

Arg Ser Ile Leu Ser Trp Glu Leu Lys Asn His Ser Ile Val Pro Thr
50 55 60

His Tyr Thr Leu Leu Tyr Thr Ile Met Ser Lys Pro Glu Asp Leu Lys
65 70 75 80

ES 2 470 816 A1

IMABIS-80_ST25-2

Val Val Lys Asn Cys Ala Asn Thr Thr Arg Ser Phe Cys Asp Leu Thr
 85 90
 Asp Glu Trp Arg Ser Thr His Glu Ala Tyr Val Thr Val Leu Glu Gly
 100 105 110
 Phe Ser Gly Asn Thr Thr Leu Phe Ser Cys Ser His Asn Phe Trp Leu
 115 120 125
 Ala Ile Asp Met Ser Phe Glu Pro Pro Glu Phe Glu Ile Val Gly Phe
 130 135 140
 Thr Asn His Ile Asn Val Met Val Lys Phe Pro Ser Ile Val Glu Glu
 145 150 155 160
 Glu Leu Gln Phe Asp Leu Ser Leu Val Ile Glu Glu Gln Ser Glu Gly
 165 170
 Ile Val Lys Lys His Lys Pro Glu Ile Lys Gly Asn Met Ser Gly Asn
 180 185 190
 Phe Thr Tyr Ile Ile Asp Lys Leu Ile Pro Asn Thr Asn Tyr Cys Val
 195 200 205
 Ser Val Tyr Leu Glu His Ser Asp Glu Gln Ala Val Ile Lys Ser Pro
 210 215 220
 Leu Lys Cys Thr Leu Leu Pro Pro Gly Gln Glu Ser Glu Ser Ala Glu
 225 230 235 240
 Ser Ala Lys Ile Gly Gly Ile Ile Thr Val Phe Leu Ile Ala Leu Val
 245 250 255
 Leu Thr Ser Thr Ile Val Thr Leu Lys Trp Ile Gly Tyr Ile Cys Leu
 260 265 270
 Arg Asn Ser Leu Pro Lys Val Leu Arg Gln Gly Leu Thr Lys Gly Trp
 275 280 285
 Asn Ala Val Ala Ile His Arg Cys Ser His Asn Ala Leu Gln Ser Glu
 290 295 300
 Thr Pro Glu Leu Lys Gln Ser Ser Cys Leu Ser Phe Pro Ser Ser Trp
 305 310 315 320
 Asp Tyr Lys Arg Ala Ser Leu Cys Pro Ser Asp
 325 330

<210> 4
 <211> 331
 <212> PRT

IMABIS-80_ST25-2

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> secuencia aminoacídica del anticuerpo de detección

<400> 4

Met Leu Leu Ser Gln Asn Ala Phe Ile Val Arg Ser Leu Asn Leu Val
 1 5 10 15

Leu Met Val Tyr Ile Ser Leu Val Phe Gly Ile Ser Tyr Asp Ser Pro
 20 25 30

Asp Tyr Thr Asp Glu Ser Cys Thr Phe Lys Ile Ser Leu Arg Asn Phe
 35 40 45

Arg Ser Ile Leu Ser Trp Glu Leu Lys Asn His Ser Ile Val Pro Thr
 50 55 60

His Tyr Thr Leu Leu Tyr Thr Ile Met Ser Lys Pro Glu Asp Leu Lys
 65 70 75 80

Val Val Lys Asn Cys Ala Asn Thr Thr Arg Ser Phe Cys Asp Leu Thr
 85 90 95

Asp Glu Trp Arg Ser Thr His Glu Ala Tyr Val Thr Val Leu Glu Gly
 100 105 110

Phe Ser Gly Asn Thr Thr Leu Phe Ser Cys Ser His Asn Phe Trp Leu
 115 120 125

Ala Ile Asp Met Ser Phe Glu Pro Pro Glu Phe Glu Ile Val Gly Phe
 130 135 140

Thr Asn His Ile Asn Val Met Val Lys Phe Pro Ser Ile Val Glu Glu
 145 150 155 160

Glu Leu Gln Phe Asp Leu Ser Leu Val Ile Glu Glu Gln Ser Glu Gly
 165 170 175

Ile Val Lys Lys His Lys Pro Glu Ile Lys Gly Asn Met Ser Gly Asn
 180 185 190

Phe Thr Tyr Ile Ile Asp Lys Leu Ile Pro Asn Thr Asn Tyr Cys Val
 195 200 205

Ser Val Tyr Leu Glu His Ser Asp Glu Gln Ala Val Ile Lys Ser Pro
 210 215 220

Leu Lys Cys Thr Leu Leu Pro Pro Gly Gln Glu Ser Glu Ser Ala Glu
 225 230 235 240

Ser Ala Lys Ile Gly Gly Ile Ile Thr Val Phe Leu Ile Ala Leu Val
 245 250 255

ES 2 470 816 A1

IMABIS-80_ST25-2

Leu Thr Ser Thr Ile Val Thr Leu Lys Trp Ile Gly Tyr Ile Cys Leu
 260 265 270
 Arg Asn Ser Leu Pro Lys Val Leu Arg Gln Gly Leu Thr Lys Gly Trp
 275 280 285
 Asn Ala Val Ala Ile His Arg Cys Ser His Asn Ala Leu Gln Ser Glu
 290 295 300
 Thr Pro Glu Leu Lys Gln Ser Ser Cys Leu Ser Phe Pro Ser Ser Trp
 305 310 315 320
 Asp Tyr Lys Arg Ala Ser Leu Cys Pro Ser Asp
 325 330

<210> 5
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador sentido

<400> 5
 taaggcctct gtcgacattt catatgattc gcctgattac acgatg

46

<210> 6
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> cebador secuencia antisentido

<400> 6
 cagaattcgc aagctttgaa aattctgatt cctggccagg tggaa

45