

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 970 868**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2017 PCT/US2017/020377**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **08.09.2017 WO17151871**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2017 E 17713512 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2023 EP 3423838**

(54) Título: **Métodos y composiciones para la detección y diagnóstico de enfermedad renal y enfermedad periodontal**

(30) Prioridad:

02.03.2016 US 201662302299 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.05.2024

(73) Titular/es:

IDEXX LABORATORIES, INC. (100.0%)
One Idexx Drive
Westbrook, ME 04092, US

(72) Inventor/es:

YERRAMILLI, MAHALAKSHMI;
FARACE, GIOSI;
QUINN, JOHN, JOSEPH y
YERRAMILLI, MURTHY, V.S.N.

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 970 868 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

Métodos y composiciones para la detección y diagnóstico de enfermedad renal y enfermedad periodontal

Antecedentes

5 La enfermedad renal se asocia con un mayor consumo de agua, micción frecuente, disminución del apetito, pérdida de peso y atrofia muscular. Generalmente, cuando se desarrollan los síntomas clínicos de la enfermedad renal, ya se ha producido un daño del riñón irreparable. La detección temprana permite un tratamiento más temprano y, a su vez, ralentiza la progresión de la enfermedad. El tratamiento actual incluye diálisis y una dieta baja en fósforo y proteínas. La detección temprana es crucial para mejorar la esperanza y la calidad de vida.

10 En los mamíferos, la progresión de la enfermedad renal se divide en cinco niveles. Los métodos actuales para detectar la enfermedad renal en mamíferos, por ejemplo, caninos, incluyen ultrasonido del riñón, biopsia o medición de los niveles de proteína/creatinina en orina. La biopsia es invasiva y la medición de la creatinina no es precisa hasta el estadio tres de la insuficiencia renal, que es después de que se ha producido un daño del tejido significativo. Se necesitan en la técnica métodos para detectar la enfermedad renal en estadios más tempranos para poder detener la progresión de la enfermedad.

Compendio

15 Una realización proporciona un método para detectar polipéptidos de Cistatina B ("Cys B") en una muestra. El método comprende poner en contacto la muestra con uno o más anticuerpos que se unen específicamente a uno o más polipéptidos que consisten en (o que comprenden) SEQ ID NO 11 en condiciones adecuadas para la formación de complejos de los polipéptidos de Cistatina B y el uno o más anticuerpos que se unen específicamente a uno o más polipéptidos que consisten en (o que comprenden) SEQ ID NO: 11. Se detectan complejos de polipéptidos de Cistatina B y los uno o más anticuerpos que se unen específicamente a uno o más polipéptidos que consisten en (o que comprenden) SEQ ID NO: 11.

20 Otra realización proporciona un método para diagnosticar una enfermedad renal en un sujeto. El método comprende determinar la cantidad de polipéptidos de Cistatina B en una muestra del sujeto, en donde la cantidad de polipéptidos de Cistatina B se determina usando uno o más anticuerpos que se unen específicamente a uno o más polipéptidos que consisten (o que comprenden) en SEQ ID NO: 11.

25 La cantidad de polipéptidos de Cistatina B en la muestra se compara con una muestra de control o estándar de control, en donde niveles elevados de polipéptidos de Cistatina B en la muestra comparada con la muestra de control o estándar de control son una indicación de enfermedad renal.

30 La afección de la enfermedad puede ser una lesión de riñón aguda o una lesión de riñón activa en un paciente con enfermedad de riñón crónica, lesión de riñón aguda, lesión de riñón activa, enfermedad de riñón crónica progresiva, enfermedad periodontal, infecciones del tracto urinario superior, enfermedad del riñón o una combinación de las mismas.

35 Aún otra realización proporciona un método para diagnosticar una enfermedad periodontal en un sujeto. El método comprende determinar la cantidad de polipéptidos de Cistatina B en una muestra del sujeto, en donde la cantidad de polipéptidos de Cistatina B se determina usando uno o más anticuerpos que se unen específicamente a uno o más polipéptidos que consisten en (o que comprenden) SEQ ID NO: 11.

40 La cantidad de polipéptidos de Cistatina B en la muestra se compara con una muestra de control o estándar de control, en donde los niveles elevados de polipéptidos de Cistatina B en la muestra comparado con la muestra de control o estándar de control son una indicación de una enfermedad periodontal en el sujeto.

45 Otra realización proporciona un método para diferenciar las infecciones del tracto urinario superior de las infecciones del tracto urinario inferior. El método comprende determinar la cantidad de polipéptidos de Cistatina B en una muestra del sujeto, en donde la cantidad de polipéptidos de Cistatina B se determina usando uno o más anticuerpos que se unen específicamente a uno o más polipéptidos que consisten en (o que comprenden) SEQ ID NO: 11. La cantidad de polipéptidos de Cistatina B en la muestra se compara con una muestra de control o estándar de control, en donde los niveles elevados de polipéptidos de Cistatina B en la muestra comparado con la muestra de control o estándar de control son una indicación de una infección del tracto urinario superior en el sujeto.

50 Otra realización proporciona un método para diferenciar una lesión del riñón aguda de las infecciones del tracto urinario inferior. El método comprende (a) determinar la cantidad de polipéptidos de Cistatina B en una muestra del sujeto, en donde la cantidad de polipéptidos de Cistatina B se determina usando uno o más anticuerpos que se unen específicamente a uno o más polipéptidos que consisten en SEQ ID NO: 11 y (b) comparar la cantidad de polipéptidos de Cistatina B en la muestra con una muestra de control o estándar de control, en donde los niveles elevados de polipéptidos de Cistatina B en la muestra en comparación con la muestra de control o estándar de control son una indicación de lesión de riñón aguda en el sujeto.

- En una realización, la enfermedad renal puede ser provocada por una enfermedad del riñón crónica, una lesión del riñón aguda o una infección bacteriana. En una realización, la enfermedad renal, la enfermedad del riñón crónica o la lesión del riñón aguda no son provocadas por cáncer. La infección bacteriana puede ser provocada por *Anaplasma sp.*, *Ehrlichia sp.*, *Leptospira sp.*, *Escherichia sp.* o *Borrelia sp.* La cantidad de polipéptidos de Cistatina B se puede determinar detectando los complejos de polipéptidos de Cistatina B y uno o más anticuerpos específicos para uno o más polipéptidos que consisten en (o que comprenden) SEQ ID NO: 11.
- En una realización, los complejos de polipéptidos de Cistatina B y uno o más anticuerpos específicos para uno o más polipéptidos que consisten en (o que comprenden) SEQ ID NO: 11 se pueden poner en contacto con un agente indicador antes de la detección. Los uno o más anticuerpos pueden unirse específicamente a uno o más polipéptidos que consisten en (o que comprenden) SEQ ID NO: 11.
- En una realización, el sujeto puede ser un animal no humano y la muestra puede ser sangre, suero, plasma, orina, saliva, placa, líquido crevicular, biopsia gingival o hisopo de lengua.
- En una realización, los polipéptidos de Cistatina B o una cantidad de polipéptidos de Cistatina B se pueden determinar mediante un inmunoensayo, un inmunoensayo competitivo, un inmunoensayo tipo sándwich, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un inmunoensayo turbidimétrico, un inmunoensayo turbidimétrico potenciado con partículas, o un ensayo de transferencia de Western,
- Aún otra realización proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a uno o más polipéptidos que consisten en (o que comprenden) SEQ ID NO: 11. El anticuerpo aislado se puede liofilizar; conjugar con un marcador; inmovilizar en un soporte sólido; unir específicamente a un polipéptido que consiste en (o que comprende) SEQ ID NO: 11 o inmovilizar en un soporte sólido y unirse específicamente a un polipéptido que consiste en (o que comprende) SEQ ID NO: 11.
- En una realización, los anticuerpos pueden inmovilizarse en un soporte sólido y pueden conjugarse con uno o más marcadores.
- Otra realización más proporciona un kit para diagnosticar una enfermedad del riñón, lesión del riñón aguda o lesión del riñón activa en un paciente con enfermedad del riñón crónica, lesión del riñón activa, enfermedad del riñón crónica progresiva, lesión del riñón aguda, infección del tracto urinario superior o enfermedad periodontal. El kit puede comprender uno o más anticuerpos que se unen específicamente a uno o más polipéptidos que consisten en (o que comprenden) SEQ ID NO: 11 y uno o más reactivos que facilitan la unión de uno o más anticuerpos a los polipéptidos de Cistatina B presentes en una muestra del sujeto.
- Otra realización proporciona uno o más polipéptidos aislados que consisten en (o que comprenden) SEQ ID NO:11. Los polipéptidos pueden liofilizarse; conjugarse con un marcador; inmovilizarse en un soporte sólido; o unirse específicamente a uno o más anticuerpos que se unen específicamente a uno o más polipéptidos que consisten en (o que comprenden) SEQ ID NO: 11.
- Otra realización más proporciona un método para diagnosticar una enfermedad renal en un sujeto mamífero, tal como un sujeto humano, canino o felino. El método comprende (a) determinar la cantidad de polipéptidos de Cistatina B en una muestra (por ejemplo, orina, sangre, plasma, suero, células, tejido); y (b) comparar la cantidad de polipéptidos de Cistatina B en la muestra con una muestra de control o estándar de control, en donde niveles elevados de polipéptidos de Cistatina B en la muestra comparado con la muestra de control o estándar de control son una indicación de enfermedad renal. La cantidad de polipéptidos de Cistatina B se puede determinar usando un anticuerpo aislado que se une específicamente a uno o más polipéptidos que consisten en (o que comprenden) SEQ ID NO: 11. La enfermedad renal en el mamífero puede ser, por ejemplo, lesión del riñón aguda o enfermedad del riñón activa en un paciente con enfermedad del riñón crónica, enfermedad del riñón crónica, enfermedad del riñón crónica progresiva, lesión del riñón aguda, lesión del riñón activa, infecciones del tracto urinario superior o infección bacteriana de los riñones. En una realización, la enfermedad renal no es cáncer o cáncer renal.
- Una realización proporciona un inmunocomplejo que comprende (i) uno o más anticuerpos aislados que se unen específicamente a uno o más polipéptidos que consisten en SEQ ID NO: 11 y (ii) uno o más polipéptidos que se unen específicamente a uno o más anticuerpos aislados. Los uno o más polipéptidos pueden ser, por ejemplo, SEQ ID NO: 11. Un inmunocomplejo es un complejo formado entre un antígeno (tal como un polipéptido) y un anticuerpo. El inmunocomplejo puede inmovilizarse en un soporte sólido.
- Las realizaciones específicas resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada de ciertas realizaciones preferidas y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el epitelio tubular normal, la alteración celular y la muerte celular en las células epiteliales del túbulo proximal.

- La Figura 2 muestra el análisis de transferencia de Western de Cistatina B en presencia de proteína Cistatina C.

La Figura 3 muestra una curva estándar obtenida con el ensayo ELISA de Cys B utilizando Cistatina B canina nativa (lisado de MDCK).

La Figura 4 muestra un análisis ELISA de Cys B de suero y orina de un modelo canino de gentamicina.

5 La Figura 5 muestra un análisis ELISA de Cys B de orina de perros que acudieron a una clínica con lesión del riñón activa inducida por inflamación o isquemia.

Los paneles A y B de la Figura 6 muestran los intervalos de referencia caninos y felinos.

Los paneles A y B de la Figura 7 muestran que los niveles de Cistatina B en orina y suero aumentaron significativamente en pacientes diagnosticados con AKI en comparación con perros sanos y pacientes con CDK.

La Figura 8 muestra los niveles de Cistatina B en pacientes sanos y con infección del tracto urinario inferior.

10 La Figura 9 muestra la detección de polipéptidos de Cys B en muestras de AKI canina, muestras de CKD humana y muestras de control negativo canino.

La Figura 10 muestra los valores de Cys B en suero de caninos sanos.

Estos y otros objetivos y características se entenderán mejor a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos en donde:

15 **Descripción detallada de la invención**

Esta invención se describe más particularmente a continuación y los Ejemplos expuestos en la presente memoria pretenden ser únicamente ilustrativos, ya que numerosas modificaciones y variaciones de los mismos resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Tal y como se utiliza en la descripción de la presente memoria y a través de las reivindicaciones siguientes, el significado de "un", "una" y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto 20 indique claramente lo contrario. El término "aproximadamente" junto con un valor numérico significa que el valor varía hacia arriba o hacia abajo en un 5%. Por ejemplo, para un valor de aproximadamente 100, significa entre 95 y 105 (o cualquier valor entre 95 y 105).

25 Los términos utilizados en la especificación generalmente tienen sus significados habituales en la técnica, dentro del contexto de las composiciones y métodos descritos en la presente memoria, y en el contexto específico donde se utiliza cada término. Algunos términos se han definido más específicamente a continuación para proporcionar orientación adicional al profesional con respecto a la descripción de las composiciones y métodos.

30 Las composiciones y métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para pronosticar, diagnosticar y controlar la progresión de varias enfermedades y afecciones, incluyendo, por ejemplo, enfermedad del riñón, lesión del riñón aguda o lesión del riñón activa en un paciente con enfermedad del riñón crónica, enfermedad del riñón crónica progresiva, enfermedad del riñón aguda, lesión del riñón activa, infecciones del tracto urinario superior y enfermedad periodontal. La enfermedad del riñón incluye cualquier afección de la enfermedad que dé como resultado (1) una disminución de la función del riñón en comparación con sujetos sanos; o (2) daño físico a los riñones; o (3) ambos. En una realización, la enfermedad del riñón no incluye cáncer o no incluye cáncer renal. Los marcadores de cáncer, incluyendo el cáncer renal, pueden ser diferentes de los de la lesión del riñón aguda o lesión del riñón activa en un paciente con enfermedad del riñón crónica, enfermedad del riñón crónica, enfermedad del riñón crónica progresiva, lesión del riñón activa, lesión del riñón aguda, infecciones del tracto urinario superior o enfermedad periodontal. En una realización, la lesión del riñón aguda en un paciente con enfermedad del riñón crónica, enfermedad del riñón crónica progresiva, lesión del riñón activa, lesión del riñón aguda, infecciones del tracto urinario superior o enfermedad periodontal no incluye cáncer o no incluye cáncer renal.

40 La enfermedad del riñón crónica (CKD) es una afección caracterizada por una pérdida gradual de la función del riñón a lo largo del tiempo. La CKD también se conoce como enfermedad renal crónica. La CKD no incluye cáncer de riñón, carcinoma de células renales, cáncer de vejiga u otros cánceres. A medida que la CKD empeora, los desechos pueden acumularse hasta niveles elevados en la sangre y puede producirse presión arterial alta, anemia, huesos débiles, mala salud nutricional y daño en los nervios. La CKD aumenta el riesgo de enfermedades del corazón y de los vasos sanguíneos y, eventualmente, puede provocar insuficiencia del riñón. La CKD puede ser provocada por diabetes, presión arterial alta y otros trastornos. La detección y el tratamiento tempranos a menudo pueden evitar que la enfermedad empeore.

45 Los estadios de la CKD en caninos como se establece por la International Renal Interest Society se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Concentración de creatinina en suero	CKD sin azotemia en estadio I	Azotemia renal leve en estadio II	Azotemia renal moderada en estadio III	Azotemia renal grave en estadio IV
mg/dL	<1,4	1,4-2,0	2,1-5,0	>5,0
Mmol/L	<125	125-179	180-439	>440

Los estadios de la CKD en felinos como se establece por la International Renal Interest Society se muestran en la Tabla 2.

5 Tabla 2

Concentración de creatinina en suero	CKD sin azotemia en estadio I	Azotemia renal leve en estadio II	Azotemia renal moderada en estadio III	Azotemia renal grave en estadio IV
mg/dL	<1,6	1,6-2,8	2,0-5,0	>5,0
Mmol/L	<140	140-250	251-440	>440

Los métodos descritos en la presente memoria pueden detectar lesión del riñón aguda o lesión del riñón activa en la CKD en estadio 1, 2, 3 o 4. En una realización, los métodos pueden detectar lesión del riñón aguda o lesión del riñón activa en la CKD en estadio 1, 2, 3 o 4 antes de que los ensayos de creatinina puedan detectar lesión del riñón aguda o lesión del riñón activa en la CKD en estadio 1, 2, 3 o 4.

La enfermedad del riñón en humanos se clasifica según la tasa de filtración glomerular (GFR). Para calcular una GFR se utiliza una fórmula que utiliza la edad, la raza, el sexo de la persona y su creatinina sérica. A continuación se muestran los cinco estadios de la CKD y la GFR para cada estadio:

- **Estadio 1** con GFR normal o alta (GFR > 90 mL/min)
- **Estadio 2** CKD leve (GFR = 60-89 mL/min)
- **Estadio 3A** CKD moderada (GFR = 45-59 mL/min)
- **Estadio 3B** CKD moderada (GFR = 30-44 mL/min)
- **Estadio 4** CKD grave (GFR = 15-29 mL/min)
- **Estadio 5** CKD en estadio terminal (GFR <15 mL/min)

20 Los métodos descritos en la presente memoria pueden detectar lesión de riñón aguda o lesión del riñón activa en humanos con CKD en estadio 1, 2, 3A, 3B, 4 o 5. En una realización, los métodos pueden detectar lesión del riñón aguda o lesión del riñón activa en humanos con CKD en estadio 1, 2, 3A, 3B, 4 o 5 antes de que los ensayos de creatinina o valores de GFR puedan detectar la lesión del riñón aguda o la lesión del riñón activa con CKD en estadio 1, 2, 3A, 3B, 4 o 5.

25 La enfermedad del riñón crónica o enfermedad renal puede ser glomerular o tubular.

La lesión del riñón aguda (AKI) se define como una disminución abrupta o rápida de la función de filtración renal. La AKI puede provocar enfermedad del riñón crónica (CKD), insuficiencia del riñón que requiere diálisis (enfermedad del riñón en estadio terminal), enfermedad cardíaca o la muerte. Incluso una AKI leve o una recuperación completa de una AKI pueden tener algunos problemas de salud a corto y largo plazo. La AKI puede ser provocada por daño al tejido del riñón debido a una disminución del flujo sanguíneo renal por cualquier causa (por ejemplo, presión arterial baja, deshidratación), exposición a sustancias nocivas para los riñones, procesos antiinflamatorios en los riñones, enfermedades sistémicas, lesiones por aplastamiento, antibióticos, sepsis o una obstrucción del tracto urinario. La AKI puede provocar acidosis metabólica, niveles elevados de potasio, uremia, cambios en el equilibrio de los fluidos corporales y efectos en otros sistemas de órganos. En una realización, AKI no incluye cáncer o no incluye cáncer renal. Los grados de AKI en felinos y caninos como se establece por la International Renal Interest Society se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Grado de AKI	Creatinina en sangre	Descripción clínica
Grado I	<1,6 mg/dl (<140 µmol/l)	AKI sin azotemia: AKI documentada (evidencia histórica, clínica, de laboratorio o de imágenes de AKI, oliguria/anuria clínica, capacidad de respuesta al volumen; y/o Aumento progresivo sin azotemia de la creatinina en sangre ≥0,3 mg/dl (≥26,4 µmol/l) en las 48 horas; y/o Oliguria medida <1 ml/kg/h) o anuria sobre las 6 horas.
Grado II	1,7-2,5 mg/dl (141-220 µmol/ml)	AKI leve: AKI documentada y azotemia estática o progresiva Aumento progresivo de la azotemia de la creatinina en sangre; ≥0,3mg/dl (≥26,4 µmol/l) en las 48 horas o, capacidad de respuesta al volumen; Oliguria medida (<1ml/Kg/h) o anuria sobre las 6 horas.
Grado III	2,6-5,0 mg/dl (221-439 µmol/l)	AKI de moderado a grave: AKI documentada y gravedad creciente de azotemia e insuficiencia renal funcional
Grado IV	5,1-10,0 mg/dl (440-880 µmol/l)	
Grado V	>10 mg/dl (>880 µmol/l)	

En una realización, los métodos descritos en la presente memoria pueden detectar AKI de grado 1, 2, 3, 4 o 5. En una realización, los métodos descritos en la presente memoria pueden detectar AKI de grado 1, 2, 3, 4 o 5 antes de que los ensayos de creatinina puedan detectar AKI de grado 1, 2, 3, 4 o 5.

- 5 La AKI se puede clasificar en humanos de la siguiente manera:

Tabla 3A

Estadio	Creatinina	Producción de urina
1	Tiempos de referencia 1,5-1,9 OR Aumento de ≥0,3 mg/dl (≥26,5 µmol/l)	< 0,5 ml/Kg/h durante 6-12 horas
2	Tiempos de referencia 2,0-2,9	< 0,5 ml/Kg/h durante ≥ 12 horas
3	Tiempos de referencia 3,0 OR Aumento en creatina en suero a ≥4,0 mg/dl (≥353,6 µmol/l) OR inicio de la terapia de remplazamiento renal OR en pacientes < 18 años, disminución en eGFR a < 35 ml/min por 1,73 m ²	< 0,3 ml/Kg/h durante ≥ 24 horas OR Anuria para ≥ 12 horas

En una realización, los métodos pueden detectar AKI en estadio 1, 2 o 3 en humanos. En una realización, los métodos pueden detectar AKI en estadios 1, 2 o 3 en humanos antes de que los ensayos de creatinina puedan detectar estadios 1, 2 o 3 en humanos.

- 5 En una realización, la enfermedad del riñón, CKD o AKI es provocada por una infección bacteriana. En una realización, la infección bacteriana es provocada por *Anaplasma sp.*, *Ehrlichia sp.*, *Leptospira sp.*, *Escherichia sp.* o *Borrelia sp.*

La lesión del riñón activa se ha definido como una lesión del riñón, un trastorno del riñón o una patología del riñón continua o progresiva. La lesión del riñón activa genera un daño acumulativo en el riñón.

Polipéptidos

10 Las Cistatinas A y B son miembros de la familia 1 de la superfamilia de Cistatinas y son proteínas relativamente pequeñas con un tamaño de alrededor de 11 kDa. En los seres humanos, estas proteínas son monoméricas y tienen un tamaño de aproximadamente 11 kDa. No están glicosiladas y no tienen los puentes disulfuro que se observan en otras superfamilias de Cistatinas. También carecen de secuencias señal y, por lo tanto, generalmente son proteínas intracelulares confinadas a la célula. Véase, Ochieng & Chaudhuri, J Health Care Poor Underserved 2010, 21 (1 Suppl):51. Cierta cantidad de Cistatina B está presente en los fluidos extracelulares y se ha purificado a partir de la orina humana. Véase, Abrahamson et al., J Biol Chem 1986, 261:11282-11289. Se ha demostrado que la Cistatina B inhibe miembros de las cisteína proteinasas lisosomales, familia de las catepsinas, específicamente catepsinas B, H y L. Véase, Green et al., Biochem J 1984 218:939; D'Amico et al., J Transl Med 2014, 12:350; Jarvinen & Rinne, Biochim Biophys Acta 1982, 708:210-217.

Los polipéptidos de Cistatina B se describen detalladamente en el Ejemplo 1 e incluyen:

20 QVKAQLEERENKKYTTFKAVTFRSQVAGTPYFIKVQVDDDEFVHLRVFQSLPHENKPLAL
SSYQTNKAKHDELAYF (SEQ ID NO:1)

MMCGAPSASQPATADTQAIAD (SEQ ID NO:2)

MMCGAPSASQPATADTQAIADQVKAKQLEERENKKYTTFKAVTFRSQVAGTXYFIKVQVDD
DEFVHLRVFQSLPHENKPLALSSYQTNKAKHDELAYF

(SEQ ID NO: 3) (en donde X puede ser cualquier aminoácido o en donde X puede ser P o N).

QTNKAKHDELAYF (SEQ ID NO:4) Cistatina B C-Terminal "Péptido 9"

25 CGAPSASQPATADTQAIAD (SEQ ID NO:5) Cistatina B N-terminal "Péptido 3-20"

CGAPSASQ (SEQ ID NO:6) Cistatina B N-terminal "Péptido 3-10"

CAIADQVKA (SEQ ID NO:7) Cistatina B N-terminal "Péptido 18-25"

FQSLPHENKPLALSS (SEQ ID NO:8) Cistatina B "Péptido 2"

SQVVAGTPYFIKVQVDDD (SEQ ID NO:9) Cistatina B "Péptido 1"

30 KHDELAYF (SEQ ID NO: 10)

MMCGAPSASQPATADTQAIADQVKAKQLEE (SEQ ID NO:11)

AIADQVKA (SEQ ID NO: 12)

SQVVAGTNYFIKVQVDDD (SEQ ID NO: 13)

35 Una realización proporciona un polipéptido purificado que comprende la SEQ ID NO:11 o un fragmento de la misma. Un fragmento polipeptídico de SEQ ID NO:11 puede consistir en menos de aproximadamente 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 (o cualquier intervalo entre aproximadamente 10 y aproximadamente 95) aminoácidos contiguos. En una realización, un fragmento polipeptídico consiste en más de aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 11. En una realización, un polipéptido o fragmento del mismo no se produce de forma natural.

40 El hecho de que los polipéptidos SEQ ID NOS: 1-2, 4-13 y 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 y 27 sean más pequeños que los polipéptidos de Cys B de longitud completa es importante porque los polipéptidos más pequeños pueden tener mayor especificidad y/o sensibilidad que los ensayos de polipéptidos de longitud completa. Estos polipéptidos más pequeños pueden ser menos costosos de fabricar y pueden obtenerse con mayor pureza que los polipéptidos de longitud completa. Además, los fragmentos más pequeños y los niveles de fragmentos más pequeños presentes en una muestra pueden ser indicativos del estado de la enfermedad. Los niveles aumentados de polipéptidos fragmentados (es decir, menos que la longitud completa) pueden ser un marcador para la enfermedad.

- Un polipéptido es un polímero de tres o más aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces amida. Un polipéptido puede modificarse postraduccionalmente. Un polipéptido purificado es una preparación de polipéptido que está sustancialmente libre de material celular, otros tipos de polipéptidos, precursores químicos, productos químicos utilizados en la síntesis del polipéptido o combinaciones de los mismos. Una preparación de polipéptido que está sustancialmente libre de material celular, medio de cultivo, precursores químicos, productos químicos utilizados en la síntesis del polipéptido tiene menos de aproximadamente 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 1 % o más de otros polipéptidos, medio de cultivo, precursores químicos y/u otros productos químicos utilizados en la síntesis. Por lo tanto, un polipéptido purificado tiene aproximadamente una pureza del 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más.
- El término "polipéptidos" puede referirse a uno o más de un tipo de polipéptido (un conjunto de polipéptidos). "Polipéptidos" también puede referirse a mezclas de dos o más tipos diferentes de polipéptidos (es decir, una mezcla de polipéptidos que incluye, pero no se limita a, proteínas de longitud completa, polipéptidos truncados o fragmentos de polipéptidos). Los términos "polipéptidos" o "polipéptido" también pueden significar cada uno de ellos "uno o más polipéptidos".
- Un polipéptido varía o difiere en aproximadamente, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos de aminoácidos (por ejemplo, adiciones, sustituciones o eliminaciones de aminoácidos) de un polipéptido mostrado en SEQ ID NOs: 1-27 o un fragmento del mismo. Cuando esta comparación requiere alineación, las secuencias se alinean para lograr la máxima homología. El sitio de variación se puede producir en cualquier parte del polipéptido.
- Los polipéptidos variantes generalmente se pueden identificar modificando una de las secuencias de polipéptidos descritas en la presente memoria y evaluando las propiedades del polipéptido modificado para determinar si es un equivalente biológico. Una variante es un equivalente biológico si reacciona sustancialmente igual que un polipéptido descrito en la presente memoria en un ensayo tal como un ensayo inmunohistoquímico, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un inmunoensayo turbidimétrico, un inmunoensayo turbidimétrico potenciado con partículas, un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo inmunoenzimático o ensayo de transferencia de Western, por ejemplo, tiene 90-110 % de la actividad del polipéptido original. En una realización, el ensayo es un ensayo de competición en donde el polipéptido biológicamente equivalente es capaz de reducir la unión del polipéptido descrito en la presente memoria a un antígeno o anticuerpo reactivo correspondiente en aproximadamente un 80, 95, 99 o 100 %. Un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido correspondiente también se une específicamente al polipéptido variante.
- Los polipéptidos variantes son al menos aproximadamente 80 %, o aproximadamente 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idénticos a las secuencias polipeptídicas mostradas en SEQ ID NOs: 1-27. Por ejemplo, un polipéptido variante de SEQ ID NOs: 1-27 puede ser aproximadamente al menos 99,5 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 90 %, 87 %, 84 %, o 81 % idéntico a SEQ ID NO: 1-27. Los polipéptidos variantes tienen una o más variaciones de aminoácidos conservadoras u otras modificaciones menores y conservan la actividad biológica, es decir, son equivalentes biológicamente funcionales de SEQ ID NOs 1-27. Un equivalente biológicamente activo tiene una función sustancialmente equivalente cuando se compara con el polipéptido correspondiente.
- Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para introducir una mutación en una secuencia de aminoácidos. Véase, por ejemplo, Ausubel (ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. (1994); Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989).). También se pueden introducir mutaciones utilizando kits disponibles comercialmente tal como "QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit" (Stratagene). La generación de un polipéptido variante funcionalmente activo mediante la sustitución de un aminoácido que no influye en la función de un polipéptido puede ser realizada por un experto en la técnica.
- Los polipéptidos variantes pueden tener sustituciones de aminoácidos conservadoras en uno o más restos de aminoácidos no esenciales predichos. Una sustitución conservadora es aquella en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de modo que un experto en la técnica de la química de péptidos esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido permanecieran sustancialmente sin cambios. En general, los siguientes grupos de aminoácidos representan cambios conservadores: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gin, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his. En una realización, un polipéptido tiene aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 o menos sustituciones de aminoácidos conservadoras.
- Como se usa en la presente memoria, el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos (o de dos secuencias de ácidos nucleicos) se determina usando el algoritmo de Karlin y Altschul (PNAS USA 87:2264-2268, 1990), modificado como en Karlin y Altschul, PNAS USA 90:5873-5877, 1993). Dicho algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al. (J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990). Las búsquedas de nucleótidos BLAST se realizan con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12. Las búsquedas de proteínas BLAST se realizan con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3. Para obtener una alineación con espacios con fines de comparación, se utiliza GappedBLAST como se describe en Altschul et al. (Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997). Cuando se utilizan los programas BLAST y GappedBLAST, los parámetros predeterminados de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST) se utilizan para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a una molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria.

- Identidad o idéntico significa similitud de secuencia de aminoácidos y tiene un significado reconocido en la técnica. Las secuencias con identidad comparten aminoácidos idénticos o similares. La identidad de secuencia es el porcentaje de aminoácidos idénticos a aquellos de la secuencia de aminoácidos original del anticuerpo, determinado después de alinear las secuencias e introducir espacios adecuadamente para maximizar la identidad de secuencia según sea necesario. Por lo tanto, una secuencia candidata que comparte un 85% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de referencia requiere que, tras el alineamiento de la secuencia candidata con la secuencia de referencia, el 85% de los aminoácidos en la secuencia candidata sean idénticos a los aminoácidos correspondientes en la secuencia de referencia, y/o constituyan cambios de aminoácidos conservadores.
- Un polipéptido o anticuerpo puede unirse covalentemente o no covalentemente a una secuencia de aminoácidos con la que el polipéptido o anticuerpo normalmente no está asociado en la naturaleza. Además, un polipéptido o anticuerpo puede unirse covalentemente o no covalentemente a compuestos o moléculas distintos de aminoácidos. Por ejemplo, un polipéptido o anticuerpo puede unirse a un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un enlazador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteínas o una combinación de los mismos. En una realización, un ligando de purificación de proteínas puede ser uno o más restos de C aminoácidos en, por ejemplo, el extremo amino o el extremo carboxi de un polipéptido. Un espaciador de aminoácidos es una secuencia de aminoácidos que normalmente no están asociados con un polipéptido o anticuerpo en la naturaleza. Un espaciador de aminoácidos puede comprender aproximadamente 1, 5, 10, 20, 100 o 1000 aminoácidos.
- Un polipéptido puede comprender además una secuencia señal (o líder) que dirige co-traduccionalmente o post-traduccionalmente la transferencia de la proteína. El polipéptido también puede comprender un enlazador u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del polipéptido (por ejemplo, poli-His), o para mejorar la unión del polipéptido a un soporte sólido. Por ejemplo, se puede conjugar un polipéptido con una región Fc de inmunoglobulina o albúmina de suero bovino.
- Un polipéptido puede unirse covalentemente o no covalentemente a una secuencia de aminoácidos con la que el polipéptido normalmente no está asociado en la naturaleza, es decir, una secuencia de aminoácidos heteróloga. Una secuencia de aminoácidos heteróloga puede ser de un organismo diferente, una secuencia sintética o una secuencia que normalmente no está localizada en el extremo carboxi o amino terminal de un polipéptido. Además, un polipéptido puede unirse covalentemente o no covalentemente a compuestos o moléculas distintos de aminoácidos, tales como reactivos indicadores. Un polipéptido puede unirse covalentemente o no covalentemente a un espaciador de aminoácidos, un enlazador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteínas o una combinación de los mismos. Un polipéptido también puede unirse a un resto (es decir, un grupo funcional que puede ser un polipéptido u otro compuesto) que potencia una respuesta inmune (por ejemplo, citocinas tal como IL-2), un resto que facilita la purificación (por ejemplo, etiquetas de afinidad tal como una etiqueta de seis histidinas, trpE, glutatión, proteína de unión a maltosa), o un resto que facilita la estabilidad del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol; grupos protectores del amino terminal tales como acetilo, propilo, succinilo, bencilo, benciloxicarbonilo o t-butiloxicarbonilo; grupos protectores del carboxilo terminal tales como amida, metilamida y etilamida). En una realización, un ligando de purificación de proteínas puede ser uno o más restos de C aminoácidos en, por ejemplo, el extremo amino terminal o el extremo carboxi terminal o ambos extremos de un polipéptido. Un espaciador de aminoácidos es una secuencia de aminoácidos que no se asocian con un polipéptido en la naturaleza. Un espaciador de aminoácidos puede comprender aproximadamente 1, 5, 10, 20, 100 o 1000 aminoácidos.
- Si se desea, un polipéptido puede ser una proteína de fusión, que también puede contener otras secuencias de aminoácidos, tales como enlazadores de aminoácidos, espaciadores de aminoácidos, secuencias señal, secuencias de transferencia de parada TMR, dominios transmembrana, así como ligandos útiles en la purificación de proteínas, tales como glutatión-S-transferasa, etiqueta de histidina y proteína A estafilocócica, o combinaciones de las mismas. Una proteína de fusión son dos o más secuencias de aminoácidos diferentes unidas operativamente entre sí. Un constructo de la proteína de fusión se puede sintetizar químicamente usando técnicas de síntesis de compuestos orgánicos mediante la unión de fragmentos polipeptídicos individuales juntos en una secuencia fija. Un constructo de la proteína de fusión también puede expresarse mediante una célula huésped modificada genéticamente (tal como *E. coli*) cultivada *in vitro*, que lleva un vector de expresión introducido que porta secuencias de DNA recombinante específicas que codifican los restos de aminoácidos en la secuencia adecuada. El polipéptido heterólogo puede fusionarse, por ejemplo, al extremo N terminal o al extremo C terminal de un polipéptido. En una proteína de fusión puede estar presente más de un polipéptido. En una proteína de fusión pueden estar presentes fragmentos de polipéptidos. Una proteína de fusión puede comprender, por ejemplo, una o más de las SEQ ID NO: 1-27, fragmentos de las mismas o combinaciones de las mismas. Los polipéptidos pueden estar en forma multimérica. Es decir, un polipéptido puede comprender dos o más copias de SEQ ID NO: 1-27 o una combinación de las mismas.
- En una realización, un polipéptido se deriva de un ser humano, conejo, ratón, canino, felino, otro mamífero o combinaciones de los mismos. Un polipéptido se puede aislar a partir de células o fuentes de tejidos usando técnicas de purificación de proteínas estándar. Los polipéptidos también pueden sintetizarse químicamente o producirse mediante técnicas de DNA recombinante. Por ejemplo, se puede sintetizar un polipéptido usando sintetizadores de péptidos convencionales.

En una realización, un polipéptido se inmoviliza de forma covalente o no covalente en una fase sólida o sustrato.

Se puede producir un polipéptido de forma recombinante. Se puede introducir un polinucleótido que codifica un polipéptido en un vector de expresión recombinante, que se puede expresar en un sistema de célula huésped de expresión adecuado usando técnicas bien conocidas en la técnica. Una variedad de sistemas de expresión de bacterias, levaduras, plantas, mamíferos e insectos están disponibles en la técnica y se puede utilizar cualquiera de dichos sistemas de expresión. Opcionalmente, un polinucleótido que codifica un polipéptido puede traducirse en un sistema de traducción libre de células. Los polipéptidos se pueden liofilizar, desecar o secar, por ejemplo liofilizar.

Polinucleótidos

Una realización incluye un polinucleótido aislado que codifica uno o más de los polipéptidos descritos en la presente memoria. Los polinucleótidos de la invención contienen menos de un genoma completo y pueden ser ácidos nucleicos monocatenarios o bicatenarios. Un polinucleótido puede ser RNA, DNA, cDNA, DNA genómico, RNA o DNA sintetizado químicamente o combinaciones de los mismos. Los polinucleótidos pueden purificarse libres de otros componentes, tales como proteínas, lípidos y otros polinucleótidos. Por ejemplo, el polinucleótido puede estar purificado en un 50%, 75%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%. En una realización de la invención, los polinucleótidos codifican un polipéptido mostrado en las SEQ ID NOs: 1-27 o fragmentos del mismo.

Los polinucleótidos de la invención pueden comprender otras secuencias de nucleótidos, tales como secuencias que codifican enlazadores, secuencias señal, secuencias de transferencia de parada TMR, dominios transmembrana o ligandos útiles en la purificación de proteínas tales como glutatión-S-transferasa, etiqueta de histidina y Proteína A Staphylococcal.

Los polinucleótidos de la invención se pueden aislar. Un polinucleótido aislado es un polinucleótido natural que no está inmediatamente contiguo a una o ambas de las secuencias genómicas flanqueantes 5' y 3' con las que está asociado de forma natural. Un polinucleótido aislado puede ser, por ejemplo, una molécula de DNA recombinante de cualquier longitud, siempre que las secuencias de ácido nucleico que se encuentran naturalmente flanqueando inmediatamente la molécula de DNA recombinante en un genoma natural estén eliminadas o ausentes. Los polinucleótidos aislados también incluyen moléculas de ácido nucleico no naturales.

Las secuencias de nucleótidos degeneradas que codifican polipéptidos de la invención también son polinucleótidos de la invención. Las secuencias de nucleótidos degeneradas son polinucleótidos que codifican un polipéptido de la invención o fragmentos del mismo, pero difieren en la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de polinucleótidos de tipo nativo, debido a la degeneración del código genético. Las moléculas de DNA complementario (cDNA), los homólogos de especies y las variantes de polinucleótidos de la invención que codifican polipéptidos biológicamente funcionales también son polinucleótidos de la invención.

Los polinucleótidos de la invención pueden comprender secuencias codificantes para polipéptidos naturales o pueden codificar secuencias alteradas que no se encuentran en la naturaleza. Si se desea, se pueden clonar polinucleótidos en un vector de expresión que comprende elementos de control de la expresión, incluyendo, por ejemplo, orígenes de replicación, promotores, potenciadores u otros elementos reguladores que impulsan la expresión de los polinucleótidos de la invención en células huésped. Un vector de expresión puede ser, por ejemplo, un plásmido, tal como pBR322, pUC o ColE1, o un vector de adenovirus, tal como un vector de adenovirus de tipo 2 o un vector de adenovirus de tipo 5. Opcionalmente, se pueden usar otros vectores, incluyendo, pero no limitado a, virus Sindbis, virus 40 de simio, vectores de alfavírus, vectores de poxvirus y vectores de citomegalovirus y retrovirales, tales como virus del sarcoma murino, virus del tumor mamario de ratón, virus de la leucemia murina de Moloney y virus del sarcoma de Rous. También se pueden utilizar minicromosomas tales como MC y MC1, bacteriófagos, fagémidos, cromosomas artificiales de levadura, cromosomas artificiales bacterianos, partículas virales, partículas similares a virus, cósmidos (plásmidos en donde se han insertado sitios cos del fago lambda) y replicones (elementos genéticos capaces de replicarse bajo su propio control en una célula).

Los métodos para preparar polinucleótidos unidos operativamente a una secuencia de control de expresión y expresarlos en una célula huésped son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, el documento de Patente U.S. Patent No. 4,366,246. Un polinucleótido de la invención está unido operativamente cuando se coloca adyacente a o cerca de uno o más elementos de control de la expresión, que dirigen la transcripción y/o traducción del polinucleótido.

Los polinucleótidos de la invención se pueden usar, por ejemplo, como sondas o cebadores, por ejemplo, cebadores de PCR, para detectar la presencia de polinucleótidos en una muestra de prueba, tal como una muestra biológica. Las sondas son moléculas capaces de interactuar con un ácido nucleico objetivo, normalmente de una manera específica de la secuencia, por ejemplo, mediante hibridación. Los cebadores son un subconjunto de sondas que pueden soportar una manipulación enzimática y que pueden hibridarse con un ácido nucleico objetivo de manera que se produzca la manipulación enzimática. Un cebador se puede preparar a partir de cualquier combinación de nucleótidos o derivados o análogos de nucleótidos disponibles en la técnica que no interfieran con la manipulación enzimática.

Una sonda o cebador puede tener aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200 o más nucleótidos contiguos que codifican los polipéptidos de la invención.

Anticuerpos

Los anticuerpos incluyen moléculas de anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos de Cistatina B descritos en la presente memoria, polipéptidos de Cistatina B variantes descritos en la presente memoria o fragmentos de los mismos. Un anticuerpo puede unirse específicamente a múltiples polipéptidos. El término "anticuerpos" se refiere a un anticuerpo intacto o una porción o fragmento del mismo que se une al antígeno que compite con el anticuerpo intacto por la unión al antígeno. El término "anticuerpos" también incluye cualquier tipo de molécula de anticuerpo o molécula de unión específica que se une específicamente a uno o más polipéptidos de Cistatina B, por ejemplo, SEQ ID NO: 11. Un anticuerpo puede ser de origen natural, de origen no natural, sintético o modificado genéticamente. Los términos "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo y similares, tal y como se usan en la presente memoria, incluyen cualquier polipéptido, glicoproteína o inmunoglobulina de origen natural, obtenible enzimáticamente, sintético o modificado genéticamente que se une específicamente a polipéptidos de Cistatina B (por ejemplo, SEQ ID No: 11) para formar un complejo.

Un anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítopo de un polipéptido descrito en la presente memoria. Se puede producir un anticuerpo *in vivo* en animales de laboratorio adecuados o *in vitro* utilizando técnicas de DNA recombinante. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Dean, Methods Mol. Biol. 80:23-37 (1998); Dean, Methods Mol. Biol. 32:361-79 (1994); Baileg, Methods Mol. Biol. 32:381-88 (1994); Gullick, Methods Mol. Biol. 32:389-99 (1994); Drenckhahn et al. Methods Cell. Biol. 37:7-56 (1993); Morrison, Ann. Rev. Immunol. 10:239-65 (1992); Wright et al. Crit. Rev. Immunol. 12:125-68 (1992). Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos policlonales administrando un polipéptido descrito en la presente memoria a un animal, tal como un ser humano u otro primate, ratón, rata, conejo, cobaya, cabra, cerdo, perro, vaca, oveja, burro o caballo. Se recoge suero del animal inmunizado y los anticuerpos se purifican a partir del plasma, por ejemplo, mediante precipitación con sulfato de amonio, seguido de cromatografía, tal como cromatografía de afinidad. Se conocen en la técnica técnicas para producir y procesar anticuerpos policlonales.

Un anticuerpo puede ser cualquier isotipo, incluyendo IgG (IgG1, IgG2, IgG2a, Ig2b, IgG3, IgG4), IgM, IgA (IgA1 e IgA2), IgD e IgE.

Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo químico o fragmentos de unión a antígeno del mismo. Un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo obtenido a partir de un grupo de anticuerpos sustancialmente homogéneos. Un grupo de anticuerpos sustancialmente homogéneos puede contener una pequeña cantidad de mutantes o variantes. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos e interactúan con un único sitio antigenógeno. Cada anticuerpo monoclonal normalmente se dirige a un único epítopo, mientras que las poblaciones de anticuerpos policlonales normalmente contienen varios anticuerpos que se dirigen a un grupo de epítopos diversos. Los anticuerpos monoclonales se pueden producir mediante muchos métodos, incluyendo, por ejemplo, métodos de hibridoma (Kohler and Milstein, Nature 256:495, 1975), métodos de recombinación (documento de Patente U.S. Pat. No. 4,816,567), y aislamiento de bibliotecas de anticuerpos de fagos (Clackson et al., Nature 352:624-628, 1991; Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991).

Los anticuerpos químicos o porciones de unión a antígeno de los mismos tienen una parte de una cadena pesada y/o una cadena ligera que se deriva de una especie específica o de una clase o subclase de anticuerpo específica, y la porción restante de la cadena se deriva de otra especie, u otra clase o subclase de anticuerpos. Véase, por ejemplo, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., J. Immunol. Methods 125:191-202 (1989); documentos de Patente U.S. Pat. Nos. 5,807,715; 4,816,567; y 4,816,397.

Los anticuerpos químicos se pueden producir usando una variedad de técnicas que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (documentos de Patente EP 239,400; PCT publication WO 91/09967; U.S. Pat. Nos. 5,225,539; 5,530,101; y 5,585,089), revestimiento o rejuvenecimiento (documentos de Patente EP 592,106; EP 519,596; Padlan, Molecular Immunology 28:489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska et al., PNAS 96:969-973 (1994)), y barajado de cadenas (documento de Patente U.S. Pat. No. 5,565,332).

En una realización, un anticuerpo químico puede comprender regiones variables y constantes de especies que son diferentes entre sí, por ejemplo, un anticuerpo puede comprender las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de un mamífero, y las regiones constantes de cadena pesada y cadena ligera de un animal diferente (tal como ratón, conejo, canino, felino o humano). El anticuerpo químico puede comprender aminoácidos adicionales que no están incluidos en las CDRs introducidas en el anticuerpo receptor, ni en las secuencias estructurales. Estos aminoácidos se pueden introducir para optimizar con mayor precisión la capacidad del anticuerpo para reconocer y unirse a un antígeno. Por ejemplo, según sea necesario, los aminoácidos en la región estructural de una región variable del anticuerpo pueden sustituirse de manera que la CDR de un anticuerpo remodelado forme un sitio de unión a antígeno apropiado. Véase Sato et al., Cancer Res. (1993) 53:851-856.

Los ejemplos no limitantes de porciones o fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno incluyen: fragmentos Fab; fragmentos Fab', fragmentos Fab'-SH, fragmentos F(ab')₂; fragmentos Fd; fragmentos Fv; moléculas Fv monocatenarias (scFv); fragmentos sdAb (nanocuerpos); anticuerpos similares a Fab (un fragmento de unión a antígeno que contiene regiones variables de una cadena pesada y una cadena ligera que es equivalente a los fragmentos Fab que se obtienen mediante digestión con papaína); anticuerpos similares a F(ab')₂ (un fragmento de

unión a antígeno que contiene dos dominios de unión a antígeno que es equivalente a los fragmentos F(ab')₂ que se obtienen mediante digestión con pepsina), anticuerpos multiespecíficos preparados a partir de fragmentos de anticuerpos, diacuerpo, anticuerpo biespecífico, anticuerpo multifuncional, anticuerpo humanizado, anticuerpo caninizado, anticuerpo humano, anticuerpo canino, anticuerpo felino, anticuerpo murino, anticuerpo de conejo, anticuerpo sintético, anticuerpo de injerto de CDR, y unidades de reconocimiento mínimas que consisten en restos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada tal como un péptido CDR3, o un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido. Otras moléculas modificadas genéticamente, tales como anticuerpos específicos de dominio, anticuerpos de dominio único, anticuerpos con dominio eliminado, anticuerpos injertados de CDR, diacuerpos, tricuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (por ejemplo, nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes), (Fv)₂ monocatenarios (sc(Fv)₂); divalente (sc(Fv)₂); anticuerpos scFFV tetravalente ([sc(Fv)]₂), y los pequeños inmunofármacos modulares (SMIPs) y los dominios IgNAR variables de tiburón también se consideran "fragmentos o porciones de unión a antígeno", como se utilizan en la presente memoria.

"Se une específicamente", "se unen específicamente" o "específico para" significa que un primer antígeno, por ejemplo, un polipéptido de SEQ ID NO:11 reconoce y se une a un anticuerpo descrito en la presente memoria con mayor afinidad que a otras moléculas no específicas. "Se une específicamente", "se unen específicamente" o "específico para" también significa que un primer anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo generado frente a la SEQ ID NO:11, reconoce y se une a la SEQ ID NO:11, con mayor afinidad que a otras moléculas no específicas. Una molécula no específica es un antígeno que no comparte ningún epítopo común con el primer antígeno. La unión específica se puede probar usando, por ejemplo, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un inmunoensayo turbidimétrico, un inmunoensayo turbidimétrico potenciado con partículas o un ensayo de transferencia de Western usando metodología bien conocida en la técnica.

En una realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un epítopo en un polipéptido establecido como SEQ ID NO: 11.

En una realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo compite por la unión con un segundo anticuerpo o anticuerpo de referencia para SEQ ID NO: 11 o fragmentos del mismo. Se puede utilizar cualquier ensayo de unión competitiva para medir la competencia entre dos anticuerpos contra el mismo antígeno. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo ELISA tipo sándwich para este fin. Los medios para analizar la reactividad cruzada son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Dowbenko et al. (1988) J. Virol. 62: 4703-4711).

Se considera que un primer anticuerpo inhibe competitivamente la unión de un segundo anticuerpo, si la unión del segundo anticuerpo al antígeno se reduce en al menos aproximadamente un 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 90% o más, en la presencia del primer anticuerpo utilizando cualquiera de los ensayos utilizados para evaluar la unión competitiva.

La unión competitiva se puede determinar proporcionando uno o más polipéptidos aislados mostrados en SEQ ID NO: 11 unidos a un soporte sólido y ensayando la capacidad de un anticuerpo para unirse a los polipéptidos o para competir con un anticuerpo descrito en la presente memoria para unirse a los polipéptidos.

Los anticuerpos incluyen anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que (a) compiten por la unión con un anticuerpo de referencia para unirse a SEQ ID NO: 11 o fragmentos de unión a antígeno del mismo; (b) se unen al mismo epítopo de SEQ ID NO: 11 o fragmentos de unión a antígeno del mismo como un anticuerpo de referencia; (c) se unen a SEQ ID NO: 11 o fragmentos de unión a antígeno del mismo con sustancialmente la misma K_d como un anticuerpo de referencia; y/o (d) se unen a SEQ ID NO: 11 o fragmentos del mismo con sustancialmente la misma tasa de eliminación que un anticuerpo de referencia, en donde el anticuerpo de referencia es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un polipéptido de SEQ ID NO: 11 o fragmentos de unión a antígeno del mismo con una afinidad de unión K_a de 10⁷ l/mol o más.

La afinidad de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo por su pareja polipeptídica puede representarse mediante una constante de disociación (K_d). La constante de disociación del equilibrio (K_d) se calcula con la relación de K_{off}/K_{on}. Véase Chen, Y. et al., 1999, J. Mol. Biol. 293: 865-881. Se conocen diversos métodos en la técnica para medir las constantes de afinidad. En una realización particular, el anticuerpo de referencia es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una afinidad de unión a un polipéptido de SEQ ID NO: 11 con una velocidad K_{on} particular/velocidad de asociación o velocidad K_{off}. En una realización, los anticuerpos se unen específicamente con una K_{on} de 6 × 10⁵ M⁻¹s⁻¹ o mejor; los anticuerpos se unen específicamente con una velocidad K_{off} de 5 × 10⁻⁶ s⁻¹ o mejor; o los anticuerpos se unen específicamente con una afinidad de unión de 500 pM, 400 pM, 300 pM, 200 pM, 100 pM, 50 pM, 40 pM, 30 pM, 20 pM o mejor.

Los anticuerpos que se unen específicamente a SEQ ID NO: 11 son particularmente útiles para detectar la presencia de polipéptidos de Cistatina B y fragmentos de los mismos presentes en una muestra, tal como suero, sangre, plasma, células, tejido, saliva, placa, líquido crevicular, biopsia gingival, hisopo de lengua o muestra de orina de un animal. Un inmunoensayo puede utilizar un anticuerpo o varios anticuerpos. Un inmunoensayo puede utilizar, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal específico para un epítopo, una combinación de anticuerpos monoclonales específicos para epítopos de un polipéptido, anticuerpos monoclonales específicos para epítopos de diferentes polipéptidos, anticuerpos policlonales específicos para el mismo antígeno, anticuerpos policlonales específicos para diferentes

antígenos, o una combinación de anticuerpos monoclonales y policlonales. Los protocolos de inmunoensayo pueden basarse, por ejemplo, en ensayos de competición, de reacción directa o de tipo sándwich utilizando, por ejemplo, anticuerpos marcados. Los anticuerpos pueden marcarse con cualquier tipo de marcador conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes, radioactivos, enzimáticos, metálicos coloidales, radioisótopos y bioluminiscentes.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden unirse a un soporte y usarse para detectar la presencia o cantidad de polipéptidos presentes en muestras en ciertas enfermedades y afecciones. Los soportes incluyen, por ejemplo, vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magletita. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se pueden liofilizar, desecar o secar, por ejemplo, liofilizar.

Los anticuerpos se pueden usar además para aislar polipéptidos mediante columnas de inmunoafinidad. Los anticuerpos pueden fijarse a un soporte sólido mediante, por ejemplo, absorción o mediante enlace covalente de modo que los anticuerpos conserven su actividad inmunoselectiva. Opcionalmente, se pueden incluir grupos espaciadores para que el sitio de unión al antígeno del anticuerpo permanezca accesible. Los anticuerpos inmovilizados pueden usarse después para unirse específicamente a la SEQ ID NO: 11 o fragmentos de la misma a partir de una muestra biológica, incluyendo, pero no limitada a, saliva, placa, líquido crevicular, biopsia gingival, hisopo de lengua, suero, sangre y orina.

Los anticuerpos también se pueden usar en estudios de inmunolocalización para analizar la presencia y distribución de un polipéptido descrito en la presente memoria durante diversos sucesos celulares o afecciones fisiológicas. Los anticuerpos también se pueden utilizar para identificar moléculas implicadas en la inmunización pasiva y para identificar moléculas implicadas en la biosíntesis de antígenos no proteicos. La identificación de dichas moléculas puede ser útil en el desarrollo de vacunas. Se pueden usar anticuerpos, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos monoclonales y anticuerpos monocatenarios, para controlar el curso de la mejora de determinadas enfermedades o afecciones. Midiendo el aumento o disminución en la cantidad de SEQ ID NO: 11 o fragmentos de la misma en una muestra de prueba de un animal, se puede determinar si un régimen terapéutico particular destinado a mejorar el trastorno es eficaz. Los anticuerpos se pueden detectar y/o cuantificar usando, por ejemplo, ensayos de unión directa tales como RIA, ELISA o ensayos de transferencia de Western.

Métodos de detección

Una realización proporciona métodos para detectar polipéptidos de Cistatina B en una muestra que comprende poner en contacto la muestra con uno o más anticuerpos específicos para SEQ ID NO: 11 en condiciones adecuadas para la formación de complejos de los polipéptidos de Cistatina B y uno o más anticuerpos específicos para SEQ ID. NÚMERO: 11.

Se detectan los complejos de polipéptidos de Cistatina B y uno o más anticuerpos específicos de SEQ ID NO: 11.

En una realización, se proporcionan métodos para detectar polipéptidos que comprenden la SEQ ID NO: 11 y fragmentos de la misma. Opcionalmente, se puede detectar la cantidad de polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 11 en una muestra. Los niveles relativos de los polipéptidos pueden usarse para diagnosticar o detectar varias enfermedades o afecciones. Se puede utilizar cualquier método conocido en la técnica para detectar polipéptidos en los métodos descritos en la presente memoria.

Los métodos de ensayo utilizados junto con los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden incluir técnicas de marcaje directo e indirecto, columnas de inmunoafinidad, perlas inmunomagnéticas, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), ensayos de aglutinación, ensayos nefelométricos, ensayos nefelométricos cuantitativos, así como anticuerpos secundarios marcados que detectan el anticuerpo primario.

Los anticuerpos pueden marcarse de forma detectable con, por ejemplo, marcadores fluorescentes que tienen longitudes de onda de excitación y emisión adaptadas para la detección usando instrumentos disponibles comercialmente tales como clasificadores de células activadas por fluorescencia. Ejemplos de marcadores fluorescentes incluyen ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina (RH), Texas Red (TX), Cy3, Hoechst 33258 y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Dichos marcadores se pueden conjugar con anticuerpos utilizando técnicas estándar (Maino et al., 1995, Cytometry 20: 127-133).

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para detectar la SEQ ID NO: 11 o fragmentos de la misma en donde los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno se unen específicamente a la SEQ ID NO: 11. Una muestra biológica puede incluir, por ejemplo, suero, sangre, células, plasma, saliva, placa, líquido crevicular, biopsia gingival, hisopo de lengua u orina de un mamífero tal como un perro, un gato o un ser humano. La muestra de prueba puede estar sin tratar, precipitada, fraccionada, separada, diluida, concentrada o purificada.

Como se usa en la presente memoria, un "paciente" o "sujeto" puede significar un animal humano o no humano, incluyendo un felino, bovino, porcino, equino o canino.

El término "muestra", "muestra de prueba", "muestra del paciente" o "muestra del sujeto" tal y como se usa en la presente memoria incluye, pero no se limita a, sangre, suero, plasma, saliva, placa, líquido crevicular, biopsia gingival, hisopo de lengua, o muestra de orina obtenida de un sujeto.

Los ensayos incluyen, pero no se limitan a, aquellos basados en competencia, reacción directa o ensayos de tipo sándwich, incluyendo, pero no limitado a, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), transferencia de Western, IFA, radioinmunoensayo (RIA), hemaglutinación (HA), inmunoensayo turbidimétrico, inmunoensayo turbidimétrico potenciado con partículas, inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA) y ensayos en placas de microtitulación (cualquier ensayo realizado en uno o más pocillos de una placa de microtitulación). Un ensayo comprende un ensayo de unión cromatográfico de flujo reversible, por ejemplo un ensayo SNAP®. Véase, por ejemplo, el documento de Patente U.S. Pat. No. 5,726,010.

Los ensayos pueden utilizar fases o sustratos sólidos o pueden realizarse mediante inmunoprecipitación o cualquier otro método que no utilice fases sólidas. Cuando se utiliza una fase o sustrato sólido, uno o más polipéptidos o anticuerpos se unen directa o indirectamente a un soporte sólido o un sustrato tal como un pocillo de microtitulación, perla magnética, perla no magnética, columna, matriz, membrana, estera fibrosa compuesta de fibras sintéticas o naturales (por ejemplo, materiales basados en vidrio o celulosa o polímeros termoplásticos, tales como polietileno, polipropileno o poliéster), estructura sinterizada compuesta de materiales particulados (por ejemplo, vidrio o diversos polímeros termoplásticos), o película de membrana fundida compuesta de nitrocelulosa, nailon, polisulfona o similares (generalmente de naturaleza sintética). En una realización, un sustrato son partículas finas sinterizadas de polietileno, comúnmente conocido como polietileno poroso, por ejemplo, polietileno poroso de 10-15 micrómetros de Chromex Corporation (Albuquerque, NM). Todos estos materiales de sustrato se pueden usar en formas adecuadas, tales como películas, hojas o placas, o se pueden recubrir, unir o laminar sobre vehículos inertes apropiados, tales como papel, vidrio, películas plásticas o telas. Los métodos adecuados para inmovilizar anticuerpos en fases sólidas incluyen interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares.

En una realización, los métodos comprenden poner en contacto una muestra de prueba con uno o una pluralidad de anticuerpos que se unen específicamente a la SEQ ID NO: 11 en condiciones que permiten complejos polipéptido/anticuerpo, es decir, immunocomplejos, para formar. Es decir, los anticuerpos se unen específicamente a uno o una pluralidad de polipéptidos de SEQ ID NO: 11 localizados en la muestra. Un experto en la técnica está familiarizado con los ensayos y condiciones que se usan para detectar la unión del complejo anticuerpo/polipéptido. Se detecta la formación de un complejo entre polipéptidos y anticuerpos en la muestra. La formación de complejos anticuerpo/polipéptido es una indicación de que hay polipéptidos presentes en la muestra del paciente.

En una realización, un complejo polipéptido/anticuerpo se detecta cuando un reactivo indicador, tal como un conjugado enzimático, que está unido al anticuerpo, cataliza una reacción detectable. Opcionalmente, se puede aplicar un reactivo indicador que comprende un compuesto generador de señales al complejo polipéptido/anticuerpo en condiciones que permitan la formación de un complejo polipéptido/anticuerpo/indicador. Se detecta el complejo polipéptido/anticuerpo/indicador. Opcionalmente, el polipéptido o anticuerpo se puede marcar con un reactivo indicador antes de la formación de un complejo polipéptido/anticuerpo. Los métodos pueden comprender opcionalmente un control positivo o negativo. Un control positivo puede contener uno o más polipéptidos, que se unirán específicamente a anticuerpos específicos para Cys B y proporcionarán un resultado positivo. Un control negativo no contiene ningún polipéptido de Cys B ni ningún polipéptido u otros componentes que se unirían específicamente o reaccionarían de forma cruzada con anticuerpos específicos de Cys B.

En una realización, uno o más anticuerpos se inmovilizan de forma covalente o no covalente en una fase sólida o sustrato. Se añade al sustrato una muestra que potencialmente comprende un polipéptido de Cys B. Se añaden al sustrato uno o más anticuerpos específicos para Cys B. Los anticuerpos pueden ser los mismos anticuerpos usados en la fase sólida o pueden ser de una fuente o especie diferente y pueden unirse a un reactivo indicador, tal como un conjugado enzimático. Las etapas de lavado se pueden realizar antes de cada adición. Se añade un cromóforo o sustrato enzimático y se deja que se desarrolle el color. La reacción de color se detiene y el color se puede cuantificar usando, por ejemplo, un espectrofotómetro.

En otra realización, uno o más anticuerpos se inmovilizan en una fase sólida o sustrato. Se añade al sustrato una muestra de prueba que potencialmente contiene un polipéptido de Cys B. Se añaden segundos anticuerpos anti-especie que se unen específicamente a polipéptidos de Cys B. Estos segundos anticuerpos anti-especie son de una especie diferente a la de los anticuerpos inmovilizados en la fase sólida. Se añaden terceros anticuerpos anti-especie que se unen específicamente a los segundos anticuerpos anti-especie y que no se unen específicamente a los anticuerpos inmovilizados a la fase sólida. Los terceros anticuerpos anti-especie pueden comprender un reactivo indicador tal como un conjugado enzimático. Las etapas de lavado se pueden realizar antes de cada adición. Se añade un cromóforo o sustrato enzimático y se deja que se desarrolle el color. La reacción de color se detiene y el color se puede cuantificar usando, por ejemplo, un espectrofotómetro.

En una realización, uno o más anticuerpos de captura pueden unirse específicamente a uno o más epítopos de un polipéptido descrito en la presente memoria. El anticuerpo o anticuerpos de captura se pueden usar para inmovilizar uno o una pluralidad de polipéptidos de SEQ ID NO: 11, por ejemplo, en un soporte sólido. Uno o más anticuerpos de detección pueden unirse específicamente al mismo o más epítopos o a uno o más epítopos diferentes de los

polipéptidos. El anticuerpo de detección se puede usar para detectar o visualizar la inmovilización del polipéptido en un soporte sólido. Esta realización es ventajosa porque es más específica y más sensible que los ensayos que utilizan solo un anticuerpo tanto para las funciones de captura como de detección.

- 5 En un tipo de formato de ensayo, uno o más anticuerpos pueden recubrirse sobre una fase sólida o sustrato. Una muestra de prueba que se sospecha que contiene polipéptidos que comprenden SEQ ID NO: 11 o fragmentos de la misma se incuba con un reactivo indicador que comprende un compuesto generador de señales conjugado con anticuerpos o fragmentos de anticuerpos específicos para dichos polipéptidos durante un tiempo y en condiciones suficientes para formar complejos antígeno/anticuerpo de anticuerpos de la fase sólida contra los polipéptidos de la muestra de prueba o el compuesto reactivo indicador conjugado con un anticuerpo específico para los polipéptidos.
- 10 La unión del reactivo indicador conjugado con anticuerpos anti-polipéptidos a la fase sólida se puede medir cuantitativamente. Una alteración mensurable en la señal en comparación con la señal generada a partir de una muestra de control o estándar de control indica la presencia de polipéptidos que comprenden SEQ ID NO: 11 o fragmentos de la misma. Este tipo de ensayo puede cuantificar la cantidad de polipéptido en una muestra de prueba.
- 15 En otro tipo de formato de ensayo, uno o más anticuerpos se recubren sobre un soporte o sustrato. Un anticuerpo se conjuga con un reactivo indicador y se añade a una muestra de prueba. Esta mezcla se aplica al soporte o sustrato. Si los polipéptidos de Cys B están presentes en la muestra de prueba, se unirán a uno o más anticuerpos conjugados con un reactivo indicador y a uno o más anticuerpos inmovilizados en el soporte. Despues puede detectarse el complejo polipéptido/anticuerpo/indicador. Este tipo de ensayo puede cuantificar la cantidad de polipeptido en una muestra de prueba.
- 20 En otro tipo de formato de ensayo, uno o más anticuerpos se recubren sobre un soporte o sustrato. La muestra de prueba se aplica al soporte o sustrato y se incuba. Los componentes no unidos de la muestra se eliminan lavando el soporte sólido con una solución de lavado. Si los polipéptidos que comprenden SEQ ID NO: 11 o fragmentos de la misma están presentes en la muestra de prueba, se unirán al anticuerpo recubierto en la fase sólida. Este complejo polipéptido/anticuerpo se puede detectar utilizando un segundo anticuerpo específico anti-especie que se conjuga con un reactivo indicador. Despues puede detectarse el complejo indicador polipéptido/anticuerpo/anticuerpo anti-especie. Este tipo de ensayo puede cuantificar la cantidad de polipéptidos en una muestra de prueba.
- 25 La formación de un complejo polipéptido/anticuerpo o un complejo polipéptido/anticuerpo/indicador se puede detectar, por ejemplo, mediante métodos radiométricos, colorimétricos, fluorométricos, de separación por tamaños o de precipitación. Opcionalmente, la detección de un complejo polipéptido/anticuerpo se realiza mediante la adición de un anticuerpo secundario que se acopla a un reactivo indicador que comprende un compuesto generador de señales. Los reactivos indicadores que comprenden compuestos generadores de señales (marcadores) asociados con un complejo polipéptido/anticuerpo se pueden detectar usando los métodos descritos anteriormente e incluyen agentes cromogénicos, catalizadores tales como conjugados enzimáticos, compuestos fluorescentes tales como fluoresceína y rodamina, compuestos quimioluminiscentes tales como dioxetanos, acridinios, fenantridinios, rutenio y luminol, elementos radiactivos, marcadores visuales directos, así como cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. Ejemplos de conjugados enzimáticos incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, betagalactosidasa y similares. La selección de un marcador particular no es crítica, pero será capaz de producir una señal por sí sola o junto con una o más sustancias adicionales.
- 30 La frase "determinar las cantidades" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a medir o identificar los niveles de uno o más polipéptidos en una muestra. Esto se puede lograr mediante metodología bien conocida en la técnica para la detección de polipéptidos que incluye el uso de anticuerpos incluyendo, por ejemplo, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un inmunoensayo turbidimétrico, un inmunoensayo turbidimétrico potenciado por partículas, o un ensayo de transferencia de Western o inmunohistoquímica. Alternativamente, los polipéptidos de SEQ ID NO: 11 pueden determinarse mediante espectrometría de masas o métodos similares conocidos por un experto en la técnica. La determinación de la cantidad de polipéptido presente en una muestra se logra mediante dichos análisis y manipulación experimental *in vitro*.
- 35
- 40
- 45

Métodos de diagnóstico

- Una realización proporciona métodos para diagnosticar una enfermedad renal en un sujeto. Los métodos comprenden determinar la cantidad de polipéptidos de Cistatina B en una muestra del sujeto, en donde la cantidad de polipéptidos de Cistatina B se determina usando uno o más anticuerpos que se unen específicamente a la SEQ ID NO: 11. La cantidad de polipéptidos de Cistatina B en la muestra se compara con una muestra de control o estándar de control, en donde niveles elevados de polipéptidos de Cistatina B en la muestra comparada con la muestra de control o estándar de control es una indicación de enfermedad renal.

- Otros métodos pueden diagnosticar AKI en pacientes con CKD o AKI. En una realización, los métodos pueden diagnosticar una función del riñón disminuida o daño físico a los riñones provocado por cáncer o cáncer renal. En otra realización, los métodos pueden diagnosticar enfermedad renal, disminución de la función del riñón o daño físico a los riñones provocado por una infección bacteriana. La infección bacteriana puede ser provocada, por ejemplo, por *Anaplasma sp.*, *Ehrlichia sp.*, *Leptospira sp.*, *Escherichia sp.* o *Borrelia sp.*

- Una realización de la invención proporciona un método para diagnosticar o detectar una enfermedad renal, función del riñón disminuida o daño físico a los riñones provocado por una infección bacteriana. El método comprende determinar la cantidad de polipéptidos de Cistatina B en una muestra del sujeto, en donde la cantidad de polipéptidos de Cistatina B se determina usando uno o más anticuerpos que se unen específicamente a uno o más polipéptidos que consisten en SEQ ID NO: 11. La cantidad de los polipéptidos de Cistatina B en la muestra se compara con una muestra de control o estándar de control, en donde los niveles elevados de polipéptidos de Cistatina B en la muestra comparado con la muestra de control o estándar de control son una indicación de enfermedad renal, función del riñón disminuida o daño físico a los riñones provocado por una infección bacteriana.
- Como se describe en la presente memoria, los polipéptidos se encuentran en cantidades o niveles más altos en muestras de sujetos enfermos en comparación con muestras de sujetos de control de sujetos no enfermos. Los niveles relativos de polipéptidos descritos en la presente memoria en muestras de sujetos pueden indicar la progresión de la enfermedad y la gravedad de la enfermedad. Es decir, en algunos casos, una mayor cantidad o nivel de polipéptidos de Cistatina B significa un estado de la enfermedad más grave.
- Los niveles elevados de polipéptidos de Cistatina B son niveles que son aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 % o más mayores que las muestras de control o los estándares de control. Los niveles elevados de polipéptidos de Cistatina B son niveles que son aproximadamente del 10 al 500% o más; aproximadamente del 20 al 500 % o más; aproximadamente del 30 al 500 % o más; aproximadamente del 40 al 500% o más; aproximadamente del 50 al 500 % o más; aproximadamente del 60 al 500 % o más; aproximadamente del 100 al 500% o más que las muestras de control o los estándares de control.
- Los niveles elevados de polipéptidos de Cistatina B también pueden ser niveles que son cantidades estadísticamente significativamente mayores cuando se comparan con muestras de control o estándares de control.
- Los niveles elevados de polipéptidos de Cistatina B también pueden ser aproximadamente 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 o más ng/ml. Los niveles de control o estándares de control de polipéptidos de Cistatina B pueden ser aproximadamente 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 20, 10 o menos ng/ml.
- Los niveles elevados de polipéptidos de Cistatina B se pueden comparar con muestras de control o estándares de control que se determinan usando sujetos de control normales que no tienen ningún tipo de enfermedad o afección del riñón, infección bacteriana o enfermedad periodontal.
- En algunas realizaciones, el nivel de polipéptidos de Cistatina B en una muestra de prueba se compara con el nivel de Cistatina B en una muestra de control de uno o más sujetos de control normales. Normalmente, el nivel de control medido en la muestra de control se compara después con el nivel de polipéptidos de Cistatina B medido en la muestra de prueba. Alternativamente, el nivel de polipéptidos de Cistatina B en la muestra de prueba se compara con un nivel de control previamente determinado o predefinido (un "estándar de control"). Por ejemplo, el estándar de control para polipéptidos de Cistatina B se puede calcular a partir de datos, tales como datos que incluyen los niveles de polipéptidos de Cistatina B en muestras de control de una pluralidad de sujetos de control normales o sanos. Los sujetos de control normales o sanos y el sujeto de prueba bajo evaluación pueden ser de la misma especie.
- Realizaciones particulares proporcionan reactivos y métodos para identificar ciertas enfermedades o afecciones en un mamífero, y más particularmente, en perros, gatos y humanos. Determinadas realizaciones proporcionan métodos para proporcionar un diagnóstico y pronóstico para pacientes. La identificación de polipéptidos de Cys B en muestras de sujetos puede ser un predictor independiente de enfermedad del riñón o un identificador de lesión del riñón aguda o lesión del riñón activa en un estadio de enfermedad del riñón crónica (por ejemplo, estadios 1-4). Los métodos permiten ventajosamente el diagnóstico y la identificación de la lesión del riñón aguda o lesión del riñón activa en una enfermedad del riñón crónica y no están influenciados ni confundidos por la edad o la masa corporal del paciente. Por consiguiente, realizaciones adicionales están dirigidas a usar dicho pronóstico del paciente renal determinado usando los polipéptidos para seleccionar terapias renales apropiadas.
- La identificación de polipéptidos de Cys B en muestras de sujetos puede ser un predictor independiente de los grados de AKI (por ejemplo, grados 1-5). Los métodos y composiciones descritas en la presente memoria permiten ventajosamente el diagnóstico y la identificación de estadios de AKI anteriores al grado tres y no se ven influenciados ni confundidos por la edad o la masa corporal del paciente.
- Los anticuerpos se pueden utilizar en un método de diagnóstico de enfermedad renal obteniendo una muestra de prueba de un animal, por ejemplo, un humano, gato o perro sospechoso de padecer una enfermedad renal. La muestra de prueba se pone en contacto con anticuerpos en condiciones que permitan la formación de complejos anticuerpo-antígeno (es decir, inmunocomplejos). Un experto en la técnica conoce las condiciones que permiten y son apropiadas para la formación de complejos antígeno/anticuerpo. La presencia o cantidad de complejos anticuerpo-antígeno se puede determinar mediante metodología conocida en la técnica.
- Las realizaciones incluyen además métodos para pronosticar la salud del paciente, controlar la progresión de la enfermedad y/o evaluar/controlar la eficacia del tratamiento identificando niveles de polipéptidos específicos en una muestra de paciente. En un aspecto, los métodos se pueden realizar en múltiples puntos de tiempo para evaluar la

progresión de la enfermedad o la eficacia del tratamiento. En una realización particular, los métodos se pueden realizar en el momento del diagnóstico y después en puntos de tiempo específicos posteriores al tratamiento en donde una terapia específica debería dar como resultado una reducción o mejora de la progresión de la enfermedad.

5 Los métodos descritos en la presente memoria también pueden indicar la cantidad o cantidad de polipéptidos que comprenden la SEQ ID NO: 11. En una realización particular, la cantidad o cantidad de determinados polipéptidos proporciona un indicador del estadio de la enfermedad (es decir, estadios 1 - 4), progresión de la enfermedad y/o un indicador de pronóstico. Con muchos reactivos indicadores, tales como los conjugados enzimáticos, la cantidad de polipéptido presente es proporcional a la señal generada. Dependiendo del tipo de muestra de prueba, se puede diluir con un reactivo tampón adecuado, concentrar o poner en contacto con una fase sólida sin ninguna manipulación. Por 10 ejemplo, se pueden usar muestras de suero o plasma que previamente se han diluido, o muestras concentradas tales como orina, para determinar la presencia y/o cantidad de polipéptido presente.

Los polipéptidos y ensayos descritos en la presente memoria se pueden combinar con otros polipéptidos o ensayos para detectar la presencia de una enfermedad renal. Por ejemplo, los polipéptidos y los ensayos se pueden combinar con reactivos adecuados para la detección o medición de creatinina o niveles generales de proteína.

15 Una realización también proporciona métodos para diferenciar infecciones del tracto urinario superior de infecciones del tracto urinario inferior. Las infecciones del tracto urinario superior son infecciones del riñón (pielonefritis). Las infecciones del tracto urinario inferior son infecciones de la vejiga (cistitis). Estas afecciones pueden ser difíciles de diferenciar. Es ventajoso para los proveedores de salud diferenciar entre una infección del tracto urinario superior y una infección del tracto urinario inferior porque los tratamientos pueden ser diferentes. Se necesitan métodos en la 20 técnica para diferenciar estas infecciones.

25 Los métodos comprenden determinar la cantidad de polipéptidos de Cistatina B en una muestra del sujeto usando uno o más anticuerpos que se unen específicamente a la SEQ ID NO: 11. La cantidad de polipéptidos de Cistatina B en la muestra se compara con una muestra de control o un estándar de control, en donde los niveles elevados de polipéptidos de Cistatina B en la muestra comparada con la muestra de control o el estándar de control son una indicación de una infección del tracto urinario superior en el sujeto.

Una realización proporciona un método para diferenciar la lesión del riñón aguda de las infecciones del tracto urinario inferior. Estas afecciones pueden ser difíciles de diferenciar. Es ventajoso para los proveedores de salud diferenciar entre una lesión del riñón aguda y una infección del tracto urinario inferior porque los tratamientos pueden ser diferentes. El método comprende determinar la cantidad de polipéptidos de Cistatina B en una muestra del sujeto, en 30 donde la cantidad de polipéptidos de Cistatina B se determina usando uno o más anticuerpos que se unen específicamente a uno o más polipéptidos que consisten en SEQ ID NO: 11. La cantidad de los polipéptidos de Cistatina B en la muestra se comparan con una muestra de control o estándar de control, en donde los niveles elevados de polipéptidos de Cistatina B en la muestra comparado con la muestra de control o estándar de control son una indicación de lesión del riñón aguda en el sujeto

35 Una realización proporciona un método para diagnosticar periodontitis en un sujeto. La enfermedad periodontal incluye la gingivitis (inflamación de las encías) y la periodontitis. La periodontitis es una enfermedad de los tejidos periodontales que provoca la pérdida de inserción y la destrucción del hueso alveolar. El diagnóstico clínico de la enfermedad periodontal se realiza mediante el reconocimiento de diversos signos y síntomas en los tejidos periodontales que indican la enfermedad. La aparición de los signos y síntomas suele aparecer mucho después del inicio de la enfermedad y después de que se ha producido un daño considerable al hueso y al tejido de soporte. Además, la enfermedad periodontal a menudo no puede evaluarse ni tratarse adecuadamente sin anestesia general en pacientes veterinarios. Se necesitan en la técnica métodos de detección temprana de la enfermedad periodontal. Los métodos comprenden determinar la cantidad de polipéptidos de Cistatina B en una muestra del sujeto. La cantidad de polipéptidos de Cistatina B se determina usando uno o más anticuerpos específicos para las SEQ ID NOs: 1-27. 40 45 La cantidad de polipéptidos de Cistatina B en la muestra se compara con una muestra de control o estándar de control, en donde los niveles elevados de polipéptidos de Cistatina B en la muestra comparado con la muestra de control o estándar de control son una indicación de enfermedad periodontal en el sujeto.

Métodos de tratamiento.

50 Determinadas realizaciones proporcionan métodos para tratar una afección de la enfermedad en un sujeto. Los métodos comprenden solicitar una prueba que proporcione los resultados de un análisis para determinar la cantidad de polipéptidos de Cistatina B en una muestra del sujeto usando uno o más anticuerpos específicos para NO: 11. El tratamiento se administra al sujeto para la afección de la enfermedad si la muestra contiene una cantidad elevada de polipéptidos de Cistatina B en comparación con una muestra de control o un estándar de control para la afección de la enfermedad.

55 Las afecciones de la enfermedad incluyen AKI, enfermedad periodontal, infecciones del tracto urinario superior y enfermedad renal. En una realización, una afección de la enfermedad no es cáncer o cáncer renal.

Los tratamientos para CDK, AKI y enfermedad renal incluyen, por ejemplo, cirugía para nefronas/ureterolitos obstrutivos, quimioterapia para la neoplasia renal, tratamiento dietético, quelantes de fosfato entérico,

5 antiproteinúricos (por ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACEI), ácidos grasos omega-3), antihipertensivos (por ejemplo, ACEI, antagonistas de los canales de calcio (CCA)), fluidoterapia para corregir la deshidratación, tratamiento de la acidosis, administración de diuréticos, diálisis, corrección de anomalías electrolíticas, antieméticos y antiácidos, eritropoyetina recombinante. Las infecciones del tracto urinario superior se pueden tratar con antibióticos. La enfermedad periodontal se puede tratar con limpieza profunda, raspado y alisado radicular, cirugía de injerto de encía, tratamientos con láser, procedimientos regenerativos (uso de membranas (filtros), injertos óseos o proteínas estimulantes de tejidos en las bolsas), implantes dentales, procedimientos de reducción de bolsas (doblar hacia atrás el tejido de las encías y eliminar las bacterias que provocan enfermedades antes de asegurar el tejido nuevamente en su lugar).

10 En una realización alternativa, los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para evaluar la eficacia de una composición o régimen de tratamiento (ya sea una composición o una dieta) para mejorar la progresión de la enfermedad. De manera similar, los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para evaluar la actividad de una composición o de regímenes de tratamiento en los niveles de los polipéptidos del paciente que comprenden la SEQ ID NO: 11.

15 **Kits**

Una realización proporciona kits para realizar los métodos descritos en la presente memoria. En determinadas realizaciones, los kits comprenden uno o una pluralidad de anticuerpos específicos para uno o una pluralidad de los polipéptidos que comprenden la SEQ ID NO: 11. Opcionalmente, en determinadas realizaciones de los kits se pueden incluir instrucciones de uso, así como anticuerpos secundarios útiles en, por ejemplo, ensayos tipo sándwich. En los 20 kits también pueden estar presentes anticuerpos marcados de forma distintiva, así como reactivos para el marcaje de los anticuerpos.

En realizaciones adicionales, los kits comprenden uno o una pluralidad de anticuerpos, cada uno de los cuales se une específicamente a uno o más polipéptidos que comprenden la SEQ ID NO: 11. En determinadas realizaciones, los 25 anticuerpos se proporcionan sobre un soporte o sustrato sólido, que incluye, sin limitación, chips, micromatrizes, perlas y similares.

Los kits (por ejemplo, artículos de fabricación) pueden ser para detectar los polipéptidos descritos en la presente memoria, o fragmentos de proteínas de los mismos en una muestra de un paciente. Un kit comprende uno o más anticuerpos y composiciones para determinar la unión de los anticuerpos a proteínas de longitud completa o fragmentos de proteínas descritos en la presente memoria. Un kit o artículo de fabricación también puede comprender uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y composiciones para determinar la unión de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos a polipéptidos en la muestra. Un kit puede comprender un dispositivo que contiene uno o más polipéptidos o anticuerpos e instrucciones para el uso de uno o más polipéptidos o anticuerpos para, por ejemplo, la identificación de una enfermedad renal en un mamífero. El kit también puede comprender material de embalaje que comprende una etiqueta que indica que uno o más polipéptidos o anticuerpos del kit se pueden usar para la 30 identificación de disfunción del riñón. En dichos kits de prueba se pueden incluir otros componentes tales como tampones, controles y similares, conocidos por los expertos en la técnica. Los polipéptidos, anticuerpos, ensayos y 35 kits descritos en la presente memoria son útiles, por ejemplo, en el diagnóstico de casos individuales de una enfermedad renal en un paciente.

40 Los kits son útiles para diagnosticar, pronosticar o controlar el tratamiento de enfermedades renales, particularmente enfermedades renales caninas, felinas y humanas.

Las realizaciones descritas ilustrativamente en la presente memoria se pueden practicar adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no se describan específicamente en la presente memoria. Así, por ejemplo, en cada caso de la presente memoria cualquiera de los términos "que comprende", "que 45 consiste esencialmente en" y "que consiste en" puede sustituirse por cualquiera de los otros dos términos, conservando al mismo tiempo sus significados habituales. Los términos y expresiones que se han empleado se utilizan como términos de descripción y no de limitación, y no existe la intención de que en el uso de dichos términos y expresiones se excluyan cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, pero se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de las realizaciones reivindicadas. Por lo tanto, debe entenderse que aunque la presente descripción se ha descrito específicamente mediante realizaciones, 50 los expertos en la técnica pueden recurrir a características opcionales, modificaciones y variaciones de los conceptos descritos en la presente memoria, y que dichas modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de estas realizaciones como se define en la descripción y las reivindicaciones adjuntas.

Se pretende que las realizaciones de los métodos que comprenden las características mencionadas anteriormente caigan dentro del alcance de la divulgación.

55 **Ejemplos**

Los Ejemplos que siguen son ilustrativos de realizaciones específicas de la divulgación y diversos usos de las mismas. Se establecen únicamente con fines explicativos y no deben considerarse limitantes.

Ejemplo 1: Secuencias de proteínas de Cys B canina

Anteriormente se creía que la Cys B canina tenía una secuencia de proteínas de 77 aa como se muestra en la SEQ ID NO:1.

QVKAQLEERENKKYTTFKAVTFRSQVVAAGTPYFIKVQVDDDEFVHLRVFQLSLPHENKPLALSSYQTNK
AKHDELAYF (SEQ ID NO:1)

- 5 Sin embargo, esta creencia no es correcta. Se cultivaron líneas de células MDCK hasta confluencia y las células adherentes se recogieron y lisaron con un tampón fisiológico que contenía un detergente. Después de la lisis, las células se centrifugaron a 10000 rpm durante 30 minutos para sedimentar los restos celulares. El sobrenadante se utilizó como una fuente de Cistatina B canina específica urinaria. Utilizando el sobrenadante, se secuenció el extremo N-terminal de 21 aa faltantes de Cys B canina mediante digestión con tripsina e identificación por LC-MS.

- 10 MMCGAPSASQPATADTQAIAD (SEQ ID NO:2)

Por lo tanto, se determinó que la secuencia completa de aminoácidos de Cys B canina (FL-Cys B) era:

MMCGAPSASQPATADTQAIADQVKAQLEERENKKYTTFKAVTFRSQVVAAGTPYFIKVQVDDDEFVHLR
VFQLSLPHENKPLALSSYQTNAKHDELAYF (SEQ ID NO:3)

Ejemplo 2: Anticuerpos contra la Cistatina B canina

A. Anticuerpos generados contra proteínas recombinantes

- 15 Se generaron anticuerpos policlonales según metodologías estándar en conejos usando proteínas recombinantes de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:3 como inmunógenos. Cada uno de los anticuerpos así generados se unió específicamente a sus respectivos inmunógenos recombinantes en un ensayo ELISA.

- 20 Se generaron anticuerpos monoclonales según metodologías estándar en ratones usando una proteína recombinante que tiene SEQ ID NO:3 como inmunógeno, con CPG como adyuvante. Siete anticuerpos monoclonales generados se unieron específicamente a sus respectivos inmunógenos recombinantes en un ensayo ELISA. Se utilizó un anticuerpo secundario de cadena H&L de IgG anti-ratón de cabra HRP para detectar la unión monoclonal. Todos los clones probados se unieron a placas recubiertas con 5 ug/ml de Cistatina B FL recombinante (SEQ ID NO: 3). La Tabla 4 muestra los datos de unión ejemplares para tres de los clones.

Tabla 4: detección de anticuerpos monoclonales contra rFL-Cys B. Datos de dilución en serie representativos de 3 clones

rFL-Cys B (ug/ml)	Monoclonales de Cys B @ 10 ug/ml		
	9A3	5E1	3H4
10	2.79	2.77	2.74
1	2.38	2.32	2.36
0.5	1.94	1.87	1.79
0.25	1.54	1.46	1.43
0.125	1.12	1.04	0.97
0.0625	0.69	0.62	0.54
0.03125	0.44	0.42	0.33
0	0.11	0.11	0.13

- 25 B: Anticuerpos generados contra péptidos sintéticos.

Los siguientes péptidos derivados de Cistatina B canina se conjugaron con KLH. Los conjugados se utilizaron como inmunógenos para la generación de anticuerpos en conejos.

Cistatina B C-terminal “Péptido 9”	QTNKAKHDELAYF	(SEQ ID NO:4)
Cistatina B N-terminal “Péptido 3-20”	CGAPSASQPATADTQAIAD	(SEQ ID NO:5)
Cistatina B N-terminal “Péptido 3-10”	CGAPSASQ	(SEQ ID NO:6)
Cistatina B N-terminal “Péptido 18-25”	QAIADQVKA	(SEQ ID NO:7)
Cistatina B “Péptido 2”	FQSLPHENKPLALSS	(SEQ ID NO:8)
Cistatina B “Péptido 1”	SQVVAAGTPYFIKVQVDDD	(SEQ ID NO:9)

- 30 Además, se generaron anticuerpos policlonales y monoclonales según metodologías estándar en ratones utilizando los péptidos SEQ ID NO:2 (N-terminal) y SEQ ID NO:5 (Péptido 3-20) como inmunógenos, con adyuvante de Freund.

Cada uno de los anticuerpos así generados se unió específicamente a sus respectivos inmunógenos recombinantes en un ensayo ELISA.

- 5 Cada uno de los anticuerpos así generados se unió específicamente a sus respectivos inmunógenos peptídicos. Por ejemplo, la Tabla 5 a continuación muestra las curvas de unión típicas de anticuerpos policlonales anti-peptidos de conejo frente a los Peptidos 1, 2 y 9 a sus respectivos inmunógenos. Los tres anticuerpos policlonales se unen con alta afinidad a sus objetivos y pueden usarse para formar un sándwich en el ELISA de Cistatina B.

Tabla 5: unión de los péptidos anti-cistatina B de conejo a los respectivos inmunógenos

Título Ab	Péptido 1	Péptido 2	Péptido 3
10	2.55	4.00	4.00
1	1.00	3.79	4.00
0.5	0.31	2.15	3.95
0.35	0.68	0.50	2.41
0.125	0.05	0.11	0.37
0.0625	0.04	0.06	0.12
0	0.04	0.04	0.05

- 10 Además, el anticuerpo anti-Péptido 9 y el anticuerpo anti-Péptido 1 se unieron específicamente a rFL-Cys B recombinante (SEQ ID NO:3) y a una proteína intracelular nativa en un lisado de células MDCK estimuladas en un ensayo ELISA. Se demostró que el anticuerpo anti-Péptido 9 se une específicamente al péptido KHDELAYF (SEQ ID NO:10) en un ensayo ELISA competitivo.

Se usaron SEQ ID NO: 11, 12 y 13 para inmunizar conejos según metodologías estándar. Cada anticuerpo se une específicamente a sus respectivos inmunógenos en un ensayo ELISA.

Ejemplo 3: Inmunoensayos para la detección de Cistatina B canina

- 15 Se desarrolló un ELISA de Cistatina B de la siguiente manera.

Anticuerpo de captura y fase sólida:

- 20 Se recubren placas de microtitulación 4BX de 96 pocillos con 10 ug/ml de antipéptido 9 de conejo purificado por afinidad durante la noche a 4°C. Las placas se lavan 3x con 1X PBS, pH 7,4 que contiene TWEEN® (polisorbato) 20 al 0,05%. Después se bloquean las placas durante 2 horas con 1xPBS, pH 7,4 que contiene BSA al 1%. Después de lavar, como anteriormente, las placas se secan a 37°C al vacío durante 4 horas. Después las placas se almacenan desecadas, a 4°C.

Preparación del anticuerpo de detección:

- 25 Se generaron siete anticuerpos monoclonales a partir de ratones inmunizados con Cistatina B recombinante de longitud completa (rFL-Cys B) (SEQ ID NO:3). Se eligió un clon (3H4) basado en su rendimiento de unión a rFL Cys B, se purificó con proteína G y se marcó 1,0 mg del anticuerpo purificado con peroxidasa de rábano picante (HRP) utilizando el método SMCC y se desaló para eliminar el exceso de HRP. El anticuerpo marcado se tituló y se utilizaron 0,25-2,0 ug/ml en los ensayos ELISA.

Protocolo ELISA de tipo sándwich de Cistatina B: suero y orina

- 30 La Cistatina B es una proteína intracelular y generalmente no circula libremente en grandes concentraciones. Esto se confirmó aún más por el hecho de que no se encontró ninguna proteína en el sobrenadante recogido de células de riñón canino estresadas. Sin embargo, la Cistatina B se purificó a partir de células de riñón canino rotas. Por lo tanto, cualquier Cistatina B que se detecte en suero u orina probablemente resulte de la ruptura y muerte de las células. En la lesión de riñón activa, es probable que la apoptosis y necrosis de las células epiteliales en el túbulos proximal den como resultado un aumento de Cistatina B sérica y urinaria (Figura 1).

- 35 La Cistatina B no se ha relacionado con la enfermedad del riñón en animales de compañía. Se generaron anticuerpos monoclonales contra Cistatina B recombinante como se describió anteriormente y se confirmó su especificidad mediante análisis de transferencia de Western en presencia de proteína Cistatina C (Figura 2). También se desarrolló un ELISA de tipo sándwich utilizando estos anticuerpos.

- 40 Para un ELISA de tipo sándwich, los estándares fueron rFL-Cys B o un lisado de detergente de sedimentos de células MDCK. Ambas preparaciones estánndar se cuantificaron mediante un método de LCMS. Las muestras de orina se diluyeron al menos 1:10 con tampón A (PO4 0,1 M; pH 7,4, que contenía al menos 0,1 % de Sarkosyl. Las muestras de suero se diluyeron al menos 1:100 en tampón A y se añadieron 100 ul a los pocillos por duplicado como

anteriormente. Se añadieron unos cien microlitros (100 μ l) por duplicado a los pocillos de captura de anticuerpos polyclonales y se incubaron durante 1 hora, agitando a temperatura ambiente. Después, las placas se lavaron 6 x con PETCHEK® wash (IDEXX Laboratories, Inc., Maine, USA) y se añadieron 100 μ l de 0,25-2 ug/ml de anticuerpo monoclonal de detección de HRP. El anticuerpo de detección se incubó durante 30 minutos con agitación, seguido de 6x lavados y se añadieron 100 μ l de sustrato TMB a los pocillos. El color se desarrolló durante 5 minutos seguido de 100 μ l de solución de parada (HCL 1 N). Las placas se leyeron en un lector de microplacas VMAX®. Se utilizó un ajuste de parámetros 4PL en el gráfico Sigma para cuantificar las incógnitas.

Se obtuvo una curva estándar con el ensayo ELISA de Cys B como se describió anteriormente, utilizando Cistatina B canina nativa (lisado de MDCK) (Figura 3).

10 Detección de Cistatina B canina en muestras de pacientes

Los niveles de Cistatina B se determinaron en la orina de perros, utilizando el ensayo ELISA de Cistatina B como se describió anteriormente y se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6: niveles de Cistatina B en caninos con enfermedad del riñón

Muestra	Estado	Cistatina B (ng/ml)
1	Sano	256
2	Sano	382
3	Sano	292
4	AKI	6027
5	AKI	7920
6	AKI	9559
7	CKD	453
8	CKD	1595
9	CKD	3373

Como se muestra en la Tabla 6, los perros sanos tenían niveles bajos de Cistatina B en su orina en comparación con la lesión de riñón aguda (activa) (AKI) y la enfermedad de riñón crónica (CKD). Las muestras de AKI mostraron niveles más altos de Cistatina B que las muestras de CKD.

La Cistatina B se midió utilizando ELISA en suero y orina a partir de un modelo canino de gentamicina (Figura 4) y en la orina de perros que acudieron a una clínica con lesión de riñón activa inducida por inflamación o isquemia (Figura 5). En el sistema modelo, los perros recibieron 10 mg/kg de gentamicina cada 8 horas hasta que la creatinina sérica alcanzó 1,5 mg/dL. En este perro se alcanzó ese punto el día 8; mientras que la Cistatina B sérica aumentó con respecto al valor inicial el día 1. Estos resultados preliminares sugieren que la Cistatina B es un marcador más temprano que la creatinina para la lesión de riñón activa. En las muestras de pacientes existe una clara separación entre pacientes sanos y aquellos diagnosticados con lesión de riñón activa.

Ejemplo 4: Detección de Cistatina B con hisopo oral

25 Se utilizó un hisopo de algodón para tomar una muestra de las encías de un canino que se sometía a un examen dental. El perro presentaba gingivitis, enfermedad de las encías así como caries severas. El hisopo se colocó en un tubo de ensayo de plástico y se almacenó a 4°C hasta su uso. El hisopo se equilibró a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se colocó en 0,5 ml de tampón de ensayo de Cistatina B que contenía un detergente durante 30 minutos. Se retiró el hisopo y se usó en el ensayo de Cistatina B como se describe anteriormente. Se utilizó un hisopo de control sin muestra para determinar la señal de fondo. El hisopo de control estaba por debajo del límite de detección (LOD), que tiene una OD promedio de 0,04, mientras que la OD del hisopo del canino sometido a un procedimiento dental extenso fue de 1,04. Esto da como resultado una relación señal a ruido S/N de 26. Véase la Tabla 7 a continuación:

Tabla 7: detección de Cistatina B en un hisopo oral

	Cistatina B (O.D. @ 450nm)	S/N
Hisopo de control	0.04	~
Hisopo canino	1.04	26

35 Se limpian los dientes de dos perros con enfermedad periodontal con un hisopo de algodón y se extrajo la Cistatina B en el tampón de ELISA de Cistatina B y se analizó como una muestra en el ensayo de Cistatina B. Como control positivo se utilizó un estándar Enriquecido con 1000 ng/ml de proteína Cistatina B canina recombinante de longitud completa. Las señales (O.D. @ 450 nm) para el control positivo de la proteína Cistatina B recombinante de longitud completa fueron 0,322, para el canino 1 fue 1,8485 y para el canino 2 fue 1,444. Los valores para los dos caninos con

enfermedad periodontal fueron más de cinco veces superiores al estándar de 1000 ng/ml del FL-Cys B de rCanine. Por tanto, Cys B es un marcador de enfermedad periodontal en mamíferos tales como los caninos.

Ejemplo 5: ELISA modificado

Se recubrieron placas de microtitulación 4BX de 96 pocillos con 5 ug/ml de anti-péptido 9 de conejo purificado por afinidad durante la noche a 4°C. Las placas se lavan 3x con 1X PBS, pH 7,4 que contiene TWEEN® (polisorbato) 20 al 0,05%. Después se bloquearon las placas durante 2 horas con 1xPBS, pH 7,4 que contenía BSA al 1%. Después de lavar, como anteriormente, las placas se secan a 37°C al vacío durante 4 horas. Después las placas se almacenan desecadas, a 4°C.

Para un ELISA de tipo sándwich, los estándares fueron rFL-Cys B o un lisado de detergente de sedimentos de células MDCK. Ambas preparaciones estándar se cuantificaron mediante un método de LCMS. Las muestras de orina se diluyeron 1:20 con tampón A (fosfato 0,1 M, pH 7,2, que contenía al menos la sal sódica de N-Dodecanoil-N-metilglicina al 1,0% (Sarkosyl, Sigma)). Las muestras de suero se diluyeron al menos 1:50 en Tampón A y se añadieron 100 ul a los pocillos por duplicado como se indicó anteriormente. Se añadieron unos cien microlitros (100 ul) por duplicado a los pocillos de captura de anticuerpos policlonales y se incubaron durante 1 hora, agitando a temperatura ambiente. Después las placas se lavaron 6 x con PETCHEK® wash (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA) y se añadieron 100 ul de 0,25-2 ug/ml de anticuerpo de detección monoclonal marcado con HRP. El anticuerpo de detección se incubó durante 30 minutos con agitación, seguido de 6 x lavados y se añadieron 100 ul de sustrato TMB a los pocillos. El color se desarrolló durante 5 minutos seguido de 100 ul de solución de parada (HCL 1 N). Las placas se leyeron en un lector de microplacas VMAX®. Se utilizó un ajuste de parámetros 4PL en el gráfico Sigma para cuantificar las incógnitas.

Ejemplo 6: Detección de Cys-B humana

Este ejemplo muestra la construcción de un ELISA para la detección de Cys B humana usando anticuerpos anti-Cys B canino. La proteína Cistatina B humana recombinante (rH FL Cys B) (SEQ ID NO: 14) se obtuvo de Genscript, USA.

>sp|P01800|CSTE_HUMAN Cistatina B OS=Rattus norvegicus GN=CSTE PR=1 SV=2
PRUNQGSSATQPATRQHRIKQVQVQLEKKEENPPVTPVNSPKRQVAGENYSPTRVQV
DEDPYVRLVNPQSLNENPFTPLVQVQVRAKSDLTYF [SEQ ID NO:14]

La reactividad cruzada de la proteína rH FL Cys B con anticuerpos generados contra la Cistatina B canina se evaluó mediante ELISA de tipo sándwich. Brevemente, se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón generados contra la secuencia de Cistatina B canina recombinante de longitud completa (rC FL Cistatina B) como reactivos de captura y se analizó su capacidad para unirse a múltiples antígenos FL Cys B recombinantes en un ELISA. Los reactivos de detección seleccionados fueron anticuerpos policlonales N-terminales de conejo anti-Cistatina B canina e IgG anti-especie de peroxidasa de rábano picante (H&L). Se encontró una serie de reactivos emparejados que proporcionaron una curva dependiente de la dosis en el ELISA. Como se muestra a continuación en la Tabla 8, tres anticuerpos monoclonales generados en ratón contra el "Péptido 9" C-terminal canino (QTNKAKHDELAYF (SEQ ID NO:4)) (IF10, 2B5 y 9A10) emparejados con anticuerpos 327 policlonales de Cistatina B N-terminal anti-canina (producidos en conejo contra CAIADQVKA (SEQ ID NO:7)), 328 (producidos en conejo contra CGAPSASQPATADTQAIA (SEQ ID NO:5)) o 329 (producidos en conejo contra CGAPSASQ (SEQ ID NO:6)) para formar un ELISA de tipo sándwich. Además, estos pares se unieron a la proteína rFl Cistatina B de rata y ratón.

Tabla 8: emparejamiento de reactivos Caninos para formar un sándwich con proteína Cistatina B recombinante Humana, de Rata y Ratón

Fase sólida monoclonal	Detección polyclonal	rFL Cys B canina	rFL Cys B de Humana	rFL Cys B de Rata	rFL Cys B de Ratón
IF10	327	3.8	0.7	2.8	3.2
ratón	328	3.4	0.1	1	2
	329	0.0	0.1	0.1	0.1
2B5	327	3.8	1.0	3.2	3.5
ratón	328	3.2	0.3	2	3
	329	0.1	0.1	0.1	0.1
9A10	327	3.8	0.5	2.8	3.5
ratón	328	3.2	0.1	1	3
	329	0.1	0.2	0.1	0.2

Utilizando el anticuerpo polyclonal de conejo N-terminal 327 como captura en fase sólida, se analizaron anticuerpos monoclonales de ratón generados contra la Cistatina B C-terminal "Péptido 9" canina QTNKAKHDELAYF (SEQ ID NO:4) para analizar su unión a rH FL Cistatina B. Véase la tabla 9. Como se muestra a continuación en la Tabla 10, un anticuerpo monoclonal C-terminal (9A10) formó un sándwich mientras que otro anticuerpo monoclonal C-terminal (2B5) no lo hizo. Se mapearon las especificidades de estos anticuerpos monoclonales y el monoclonal 9A10 reconoció una secuencia homóloga de Cistatina B tanto humana como canina. El anticuerpo monoclonal 3H4 generado contra

la Cistatina B canina rFL emparejado con el anticuerpo policlonal 327 unido a la fase sólida mostró unión a rFL Cistatina B tanto humana como canina (Tabla 11).

Tabla 9

Secuencias de Cistatina B C-terminal		
Canina	QTNKAKHDELAYF	SEQ ID NO:4
Humana	QTNKAKHDELTYF	SEQ ID NO:15

Tabla 10: mapeo de epítopos de anticuerpos policlonales de conejo y monoclonales de ratón de Cistatina B

Secuencia peptídica	Anticuerpos anti-peptido		
	Policlonal	Monoclonal	
	Anti-Pep 9	2B5	9A10
QTNKAKHDELAYF	<u>3.4</u>	<u>2.5</u>	<u>2.8</u>
SEQ ID NO:4			
QTNKAKHDELAY	<u>3.4</u>	0.2	<u>2.8</u>
SEQ ID NO:16			
QTNKAKHDELA	<u>3.1</u>	0.2	<u>2.4</u>
SEQ ID NO:17			
QTNKAKHDEL	<u>2.3</u>	0.1	0.1
SEQ ID NO:18			
QTNKAKHDE	<u>2.3</u>	0.2	0.1
SEQ ID NO:19			
Residuos esenciales para el epítopo		YF	AYF

5

Tabla 11

		rFL-Cistatina B	
Captura	Conjugado	Humana	Canina
327	3H4	<u>0.911</u>	<u>2.102</u>
	9A10	<u>0.822</u>	<u>1.584</u>
	2B5	0.065	0.065
	327	0.077	<u>1.211</u>

Se pueden usar anticuerpos específicos para Cys B canina para detectar Cys B humana. En particular, anticuerpos o fragmentos de unión específicos de los mismos que se unen a epítopos que comprenden AYF, LAYF (SEQ ID NO:20), ELAYF (SEQ ID NO:21), DELAYF (SEQ ID NO:22), HDELAYF (SEQ ID NO:23), KHDELAYF (SEQ ID NO: 10), AKHDELAYF (SEQ ID NO:24), KAKHDELAYF (SEQ ID NO:25), NKAKHDELAYF (SEQ ID NO:26), TNKAKHDELAYF (SEQ ID NO:27) y QTNKAKHDELAYF (SEQ ID NO:4), o porciones de los mismos pueden utilizarse para detectar Cys B humana y canina.

Ejemplo 7: Determinación de intervalos de referencia en orina canina y felina

Se recolectaron muestras de orina de caninos y felinos en un hospital veterinario local durante un período de tiempo de dos años. La orina se dividió en alícuotas y se congeló hasta su uso. Se midieron muestras de orina descongeladas para determinar la Cistatina B usando el ensayo ELISA descrito en el ejemplo 3. Se estableció un intervalo de referencia a partir de animales sanos que no tenían indicios de trastornos renales en el examen veterinario, tales como niveles de creatinina sérica o SDMA que sugerían CKD, antecedentes o presentación de cálculos del tracto urinario o infecciones del tracto urinario. Así, se utilizó un total de 280 caninos sanos y 42 felinos sanos y se determinó un intervalo de referencia de 257 ng/ml utilizando las desviaciones estándar media + 3 (Std Dev) para cada especie. Véase la Figura 6. Por lo tanto, el intervalo normal y sano es de aproximadamente 0 ng/ml a aproximadamente 257 ng/ml (por ejemplo, de aproximadamente 0, 5, 10, 20, 50, 75, 100 a aproximadamente 200, 210, 225, 250, o 257 ng/ml). Los valores superiores a 257 ng/ml (por ejemplo, de aproximadamente 257, 260, 270, 280, 290, 300 ng/ml y superiores) son indicativos de enfermedad renal.

Ejemplo 8: Cistatina B en población canina con AKI

Se analizaron veinticinco muestras de orina y suero coincidentes de perros con AKI clínicamente confirmada y de perros sanos en ELISA de Cistatina B (Ejemplo 5). La etiología de los pacientes con AKI incluyó, por ejemplo, fármacos nefrotóxicos, mordeduras de serpientes, insolación, exposición al etilenglicol y enfermedades infecciosas. Como se muestra en la Figura 7A-B y las Tablas 12-13, los niveles de Cistatina B en orina y suero aumentaron significativamente en pacientes diagnosticados con AKI en comparación con perros sanos y pacientes con CKD.

Tabla 12

	Resumen de la variabilidad para sCys B ng/ml									
	Err. Estand.									
	Media	Desv. Estd.	Media	Menor 95%	Sup. 95%	Mínimo	Máximo	Intervalo	Media	Observaciones
Diagnóstico (AKI)	1075.048	1025.574	207.4402	318.3729	1833.822	133	4173	3832	842	23
Diagnóstico (CKD)	3063.527	1509.582	524.7329	802.3729	3227.674	604	4870	3971	1763	8
Diagnóstico (sano)	636	353.5146	121.1729	322.3129	921.9821	210	1246	1148	668	5

Tabla 13

	Resumen de la variabilidad para uCys B ng/ml									
	Err. Estand.									
	Media	Desv. Estd.	Media	Menor 95%	Sup. 95%	Mínimo	Máximo	Intervalo	Media	Observaciones
Diagnóstico (AKI)	1018.5721	111.2463	279.32	371.65	14	1803	1799	704	22	7
Diagnóstico (CKD)	322.257	139.6355	37.2512	107.9329	1814.016	14	3803	3799	704	8
Diagnóstico (sano)	436.25	264.5473	63.3626	217.3629	670.5227	37	802	773	429	5

Ejemplo 9: Cistatina B en enfermedades infecciosas

- 10 La mayoría de las enfermedades infecciosas del sistema urinario en animales son infecciones bacterianas aeróbicas. Los organismos comunes incluyen *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, y *Streptococcus*. Los organismos menos comunes que provocan infecciones incluyen *Klebsiella*, *Proteus*, y *Pseudomonas*. *Mycoplasma* es una causa poco común de infección del tracto urinario y generalmente se encuentra como una coinfeción con bacterias. La leptospirosis es una enfermedad zoonótica mundial provocada por la bacteria *Leptospira* filamentosas que infecta el riñón y muchos otros órganos. Las rickettsias (rickettsiosis) y las enfermedades relacionadas (anaplasmosis, ehrlichiosis, fiebre Q, tifus de los matorrales) son provocadas por un grupo de coccobacilos gramnegativos, estrictamente intracelulares. La babesia, una enfermedad transmitida por garrapatas, también se ha relacionado con la enfermedad renal.
- 15 Las muestras de suero de veinte pacientes caninos confirmaron positivo para *Leptospira sp.* mediante ELISA, PCR y prueba de aglutinación microscópica (MAT), se analizaron títulos > 1:800 (IDEXX Laboratories, Inc.) en el ELISA de Cistatina B. También se analizaron muestras de suero canino sano confirmado para determinar el nivel promedio de Cistatina B en suero. Como se muestra a continuación en la Tabla 14, nueve muestras positivas para Leptospirosis (45%) estuvieron por encima del valor de corte relativo (media +3SD) del suero de los caninos sanos (149,1 ng/ml) (Figura 10). Estos datos indican que el 45% de los pacientes con leptospirosis evaluados tenían una lesión del riñón. Por lo tanto, los niveles elevados de Cistatina B en suero indican la presencia de lesión de riñón en pacientes infectados con *Leptospira*.
- 20
- 25

Tabla 14: Resultados de ELISA de Cistatina B para Leptospira sp. Muestras positivas

ID de la muestra	Cistatina B (ng/ml)
1304	99
2648	875
4282	241
4318	171
4558	411
4567	82
4628	133
4650	145
4873	767
4972	276
5242	65
5369	54
5529	292
5614	75
5646	68
5651	81
5659	203
5663	167
5664	131
5679	59
5694	141

Ejemplo 10: Cistatina B en infecciones del tracto urinario

Se analizaron muestras de orina de 10 perros cada uno con infección del tracto urinario (UTI) clínicamente confirmada y de 10 cohortes sanos en el ensayo de Cistatina B. La UTI se confirmó mediante cultivos positivos y examen clínico.

- 5 La interferencia de la UTI es un problema importante para la especificidad de los marcadores de AKI previamente conocidos. La Figura 8 demuestra que los niveles de Cistatina B no mostraron diferencias significativas entre pacientes sanos y pacientes con infección del tracto urinario inferior. Por lo tanto, el marcador Cistatina B se puede utilizar para diferenciar entre AKI y UTI.

Ejemplo 11: Cistatina B en la enfermedad del riñón felina

- 10 Se obtuvieron muestras de orina de cuatro felinos diagnosticados con enfermedad renal y tres controles sanos de una clínica veterinaria local, y se analizaron en el ensayo de Cistatina B. Las concentraciones urinarias de Cistatina B en cada uno de los cuatro gatos con enfermedad renal excedieron el intervalo de referencia de 257 ng/ml. Las concentraciones de Cistatina B en orina en cada uno de los tres controles sanos estaban dentro del intervalo de referencia. Véase la Tabla 15. La Cistatina B es un marcador para la enfermedad renal en gatos.

Tabla 15

Cistatina B urinaria ng/ml.	Creatinina en suero mg/dL	SDMA (ug/dL), u otras pruebas según lo indicado	Diagnóstico
3062	3.0 (03/02/2016) 2.9 (04/03/2016) 2.6 (08/27/2016)	N/D (3/2/2016) 16 (4/1/2016) 26 (8/27/2016)	Enfermedad renal
1513	2.0 (02/13/2013) 2.4 (03/20/2014) 3.1 (10/06/2015)	Proteína urina 30 mg/dL; Urina 250 eritrocitos/uL	Enfermedad renal
903	1.3 (7/17/2015) 3.6 (11/16/2015) 2.4 (11/23/2015) 2.0 (12/10/2015) 3.8 (02/01/2016)	N/D	Enfermedad renal
329	2.0 (02/13/2013) 2.4 (03/20/2014) 3.1 (10/06/2015)	Proteína urina 30 mg/dL; Urina 250 eritrocitos/uL	Enfermedad renal
73	N/D	N/D	sano
80	N/D	N/D	sano
48	N/D	N/D	sano

N/D = no determinado

Ejemplo 12: Anticuerpos anti-Cistatina B en ovejas

- 5 Se usaron dos ovejas para generar anticuerpos polyclonales de oveja contra SEQ ID NO:4. El péptido se conjugó con KLH y se emulsionó en adyuvante completo de Freund. Se utilizó un protocolo estándar de 200 días. La respuesta de anticuerpos en suero de oveja se comparó con la del suero de conejo. Se observaron títulos similares en las ovejas a pesar de que se encontraban en los primeros estadios del protocolo de inmunización. Los anticuerpos generados en ovejas se pueden utilizar para la detección de polipéptidos de Cys B.

Tabla 16

Dilución	Conejo	Oveja
100	2.832	2.804
1000	2.753	2.988
10000	1.56	0.797
100000	0.296	0.076
1000000	0.04	0.017
10000000	0.008	0.001

Ejemplo 13: Detección de Cistatina B en orina humana en un paciente con CKD:

- 10 Se recogió orina de un paciente humano diagnosticado con CKD en estadio 4. La orina se diluyó en serie y se analizó en un ELISA de Cistatina B en orina. Se compararon dos anticuerpos monoclonales anti-Cistatina B (3H4 (véanse Ejemplos 2 y 3) y 9A10 (véase Ejemplo 6)). Como se muestra en la Figura 9, la muestra de orina humana generó niveles más altos de Cistatina B que la muestra de AKI canina y niveles más altos que el control negativo canino. Además, los diferentes monoclonales anti-Cistatina B mostraron diferentes respuestas, presumiblemente debido a la disponibilidad de los epítropos para la unión. Por lo tanto, la enfermedad renal, incluyendo la CKD, se puede diagnosticar en humanos utilizando anticuerpos específicos para la Cistatina B.
- 15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para detectar polipéptidos de Cistatina B en una muestra que comprende poner en contacto la muestra con uno o más anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos que consisten en SEQ ID NO: 11 en condiciones adecuadas para la formación de complejos de los polipéptidos de Cistatina B y el uno o más anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos que consisten en SEQ ID NO: 11, y detectar los complejos de polipéptidos de Cistatina B y uno o más anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos que consisten en SEQ ID NO: 11.
- 10 2. Un método para diagnosticar una enfermedad renal en un sujeto al:
 - (a) determinar la cantidad de polipéptidos de Cistatina B en una muestra del sujeto, en donde la cantidad de polipéptidos de Cistatina B se determina usando uno o más anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos que consisten en SEQ ID NO: 11; y
 - (b) comparar la cantidad de polipéptidos de Cistatina B en la muestra con una muestra de control o estándar de control, en donde niveles elevados de polipéptidos de Cistatina B en la muestra comparado con la muestra de control o estándar de control es una indicación de una enfermedad renal.
- 15 3. Un método para diferenciar infecciones del tracto urinario superior de infecciones del tracto urinario inferior que comprende:
 - (a) determinar la cantidad de polipéptidos de Cistatina B en una muestra del sujeto, en donde la cantidad de polipéptidos de Cistatina B se determina usando uno o más anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos que consisten en SEQ ID NO: 11; y
 - (b) comparar la cantidad de polipéptidos de Cistatina B en la muestra con una muestra de control o estándar de control, en donde niveles elevados de polipéptidos de Cistatina B en la muestra comparado con la muestra de control o estándar de control son una indicación de una infección del tracto urinario superior en el sujeto.
- 20 4. Un método para diferenciar la lesión del riñón aguda de las infecciones del tracto urinario inferior que comprende:
 - (a) determinar la cantidad de polipéptidos de Cistatina B en una muestra del sujeto, en donde la cantidad de polipéptidos de Cistatina B se determina usando uno o más anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos que consisten en SEQ ID NO: 11; y
 - (b) comparar la cantidad de polipéptidos de Cistatina B en la muestra con una muestra de control o estándar de control, en donde niveles elevados de polipéptidos de Cistatina B en la muestra comparado con la muestra de control o estándar de control son una indicación de una lesión del riñón aguda en el sujeto.
- 25 5. El método de la reivindicación 2, en donde la enfermedad renal es provocada por una lesión del riñón aguda o una lesión del riñón activa en pacientes con una enfermedad del riñón crónica, una enfermedad del riñón crónica progresiva, una lesión del riñón aguda, una lesión del riñón activa o una infección bacteriana.
- 30 6. El método de la reivindicación 2, en donde la enfermedad renal no está provocada por cáncer.
- 35 7. El método de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, en donde la cantidad de polipéptidos de Cistatina B se determina detectando los complejos de polipéptidos de Cistatina B y uno o más anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos que consisten en SEQ ID NO: 11.
- 40 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 o 4, en donde los anticuerpos se conjugan con uno o más marcadores.
9. 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 o 4, en donde la muestra es sangre, suero, plasma u orina.
- 45 10. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a polipéptidos que consisten en SEQ ID NO: 11.
11. El anticuerpo aislado de la reivindicación 10, en donde el anticuerpo aislado es:
 - (a) liofilizado, desecado o secado;
 - (b) conjugado con un marcador;
 - (c) inmovilizado en un soporte sólido; o
 - (d) unido específicamente a un polipéptido que consiste en SEQ ID NO: 11; o
 - (e) inmovilizado en un soporte sólido y unido específicamente a un polipéptido establecido en SEQ ID NO: 11.

12. Un polipéptido aislado que consiste en SEQ ID NO: 11.

13. El polipéptido aislado de la reivindicación 12, en donde el polipéptido es:

(a) liofilizado, desecado o secado;

(b) conjugado con un marcador;

5 (c) inmovilizado en un soporte sólido; o

(d) unido específicamente a uno o más anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos establecidos en SEQ ID NO: 11.

14. Un inmunocomplejo que comprende

(i) uno o más anticuerpos aislados que se unen específicamente a polipéptidos que consisten en SEQ ID NO: 11 y

10 (ii) uno o más polipéptidos que se unen específicamente a uno o más anticuerpos aislados.

Figura 1

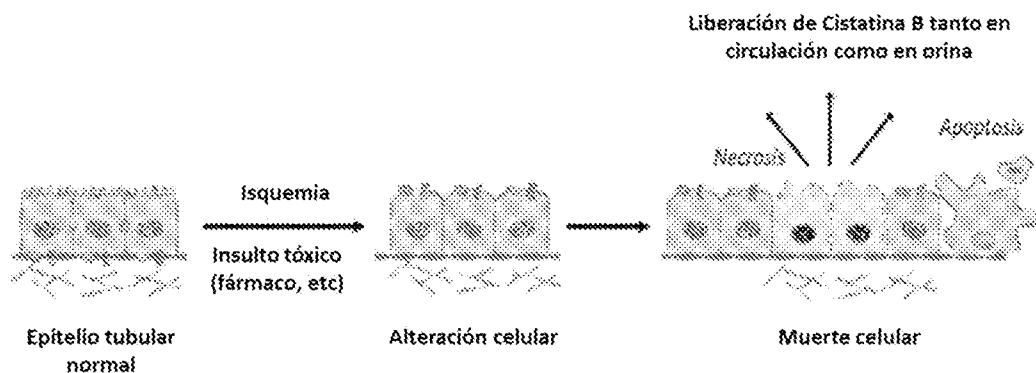
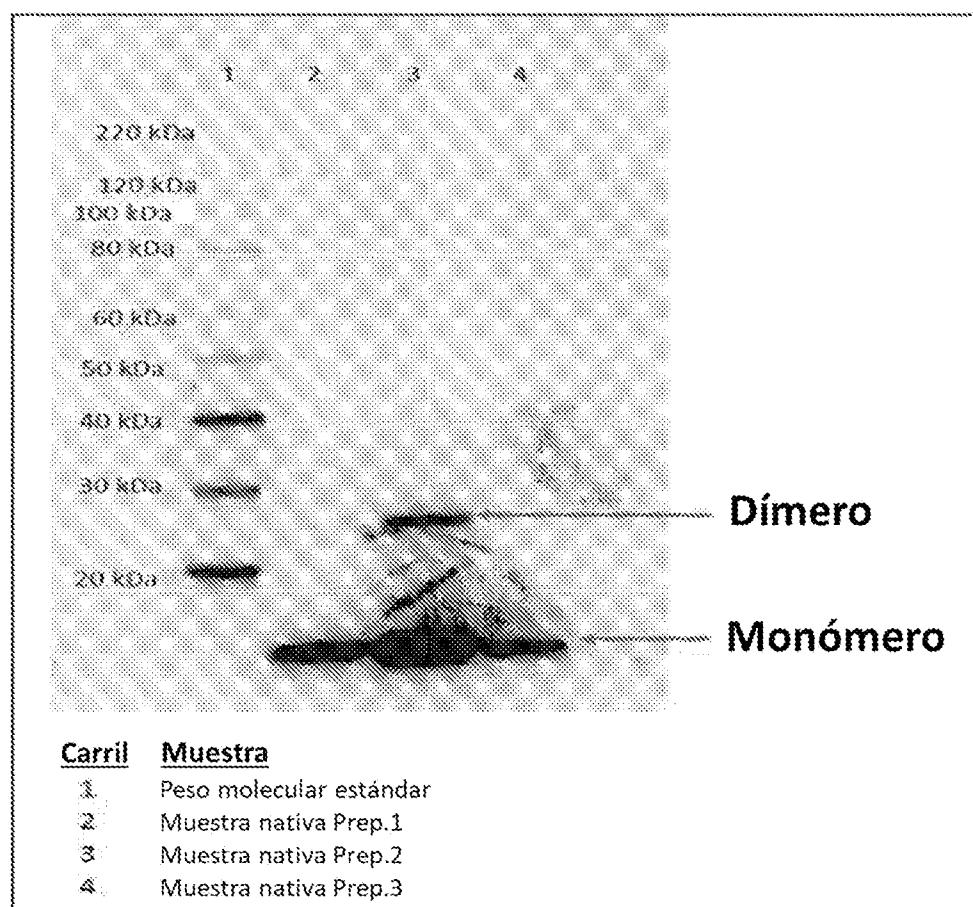


Figura 2



ES 2 970 868 T3

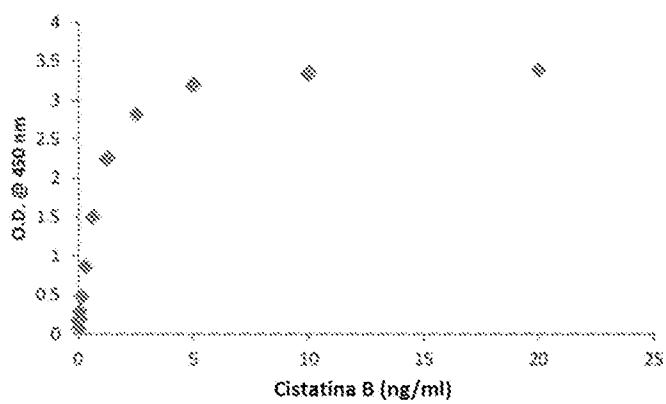


Figura 3

Figura 4

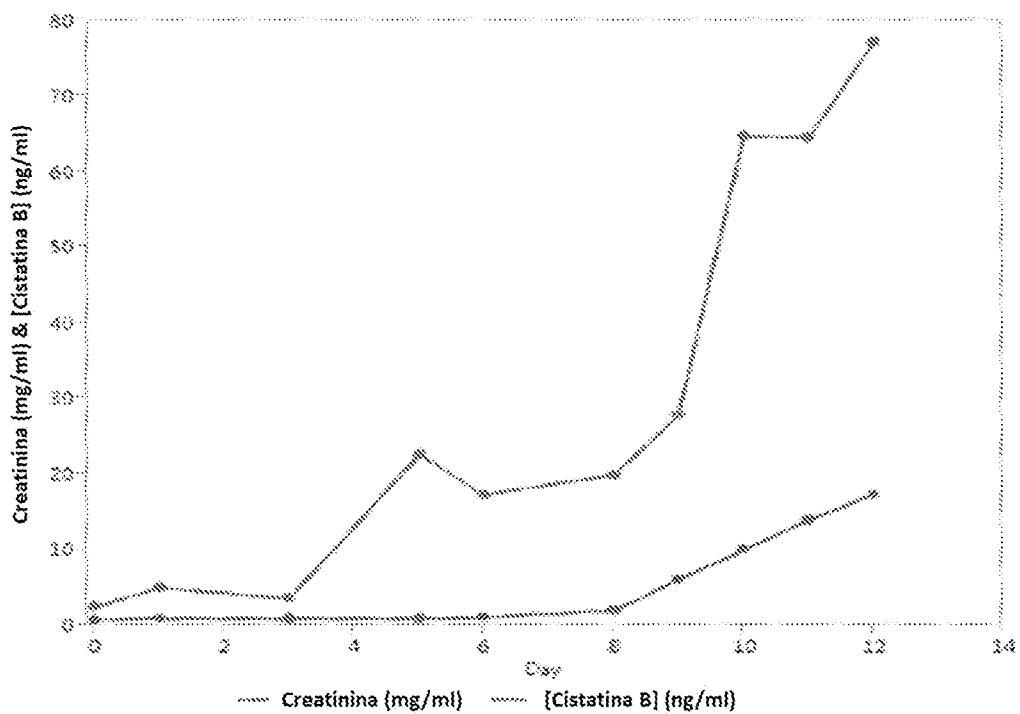
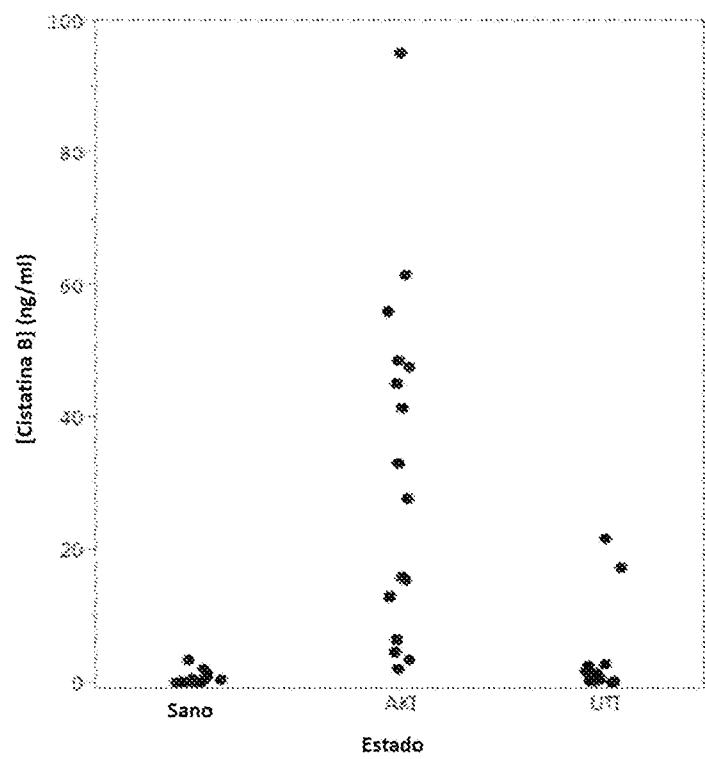
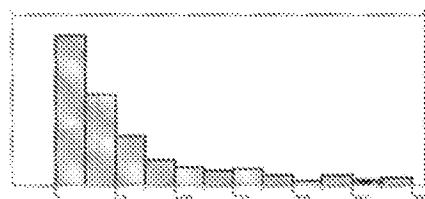
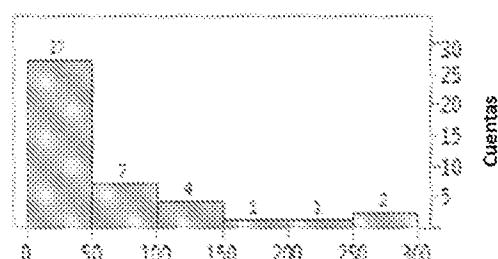


Figura 5



A: intervalo de referencia canino

Media	59.757143
Desv. Estand.	66.055464
Error estand. Medio	3.947569
Media superior al 95%	67.527945
Media inferior al 95%	51.986341
N	280

B: intervalo de referencia felino

Media	56.643857
Desv. Estand.	67.102696
Error estand. Medio	10.334171
Media superior al 95%	77.555529
Media inferior al 95%	35.732185
N	42

Figura 6

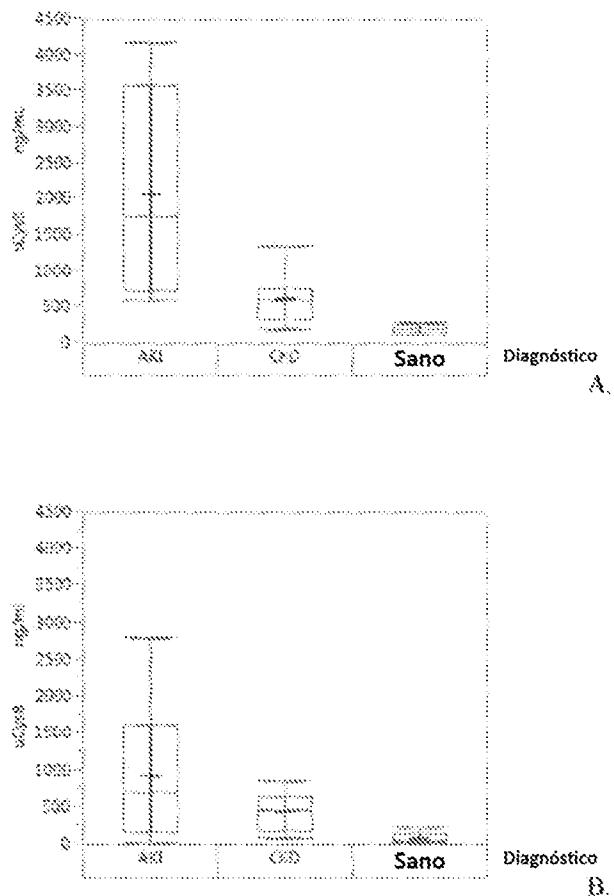


Figura 7

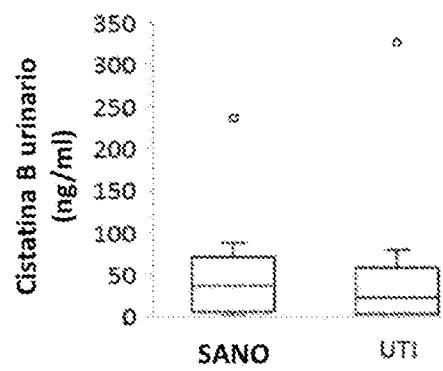


Figura 8

Tabla de variabilidad para Cistatina B (ng/ml)

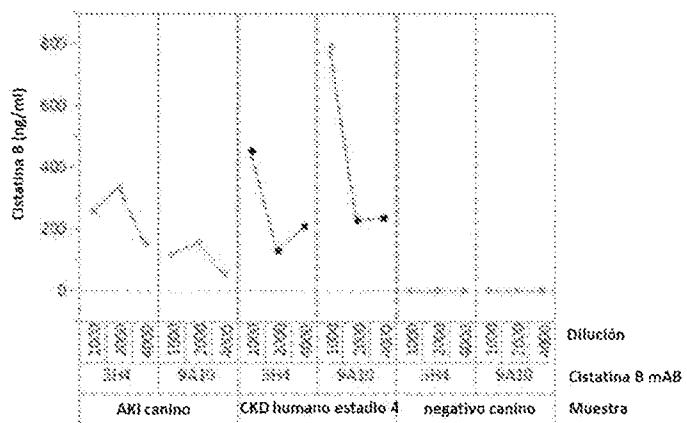
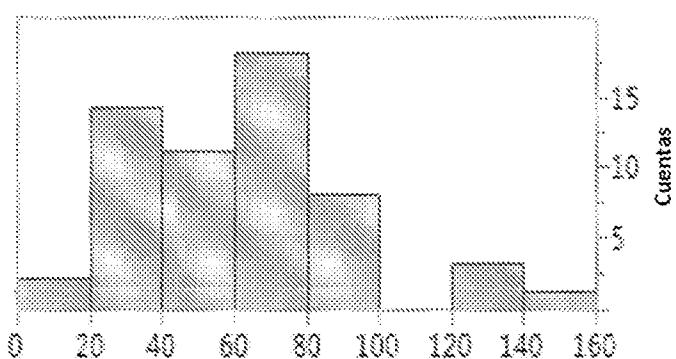


Figura 9

ES 2 970 868 T3

Figura 10: población Cistatina B negativa (n=058)



Media: 60.927313

Desv. Estand.: 29.473122

Err. Estand. medio: 3.8700105

Media superior al 95% : 68.676875

Media inferior al 95% : 53.177751

N: 58