



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 368 293**

② Número de solicitud: 201030630

⑤ Int. Cl.:

C12N 9/00 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **28.04.2010**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.11.2011

⑰ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 80 %)
Avda. María Luisa, s/n
Palacio-Pabellón de Perú
41013 Sevilla, ES
Servicio Andaluz de Salud (Titular al 20 %)

⑱ Inventor/es: **Matesanz del Barrio, Fuencisla;**
Fedetz, María;
Ndagire, Dorothy;
Alcina Madueño, Antonio y
Sabio, Mario

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Acil Coenzima-A sintetasas de cadena larga (ACSLs) como biomarcadores cito-serológicos en enfermedades inflamatorias o autoinmunes.**

㉑ Resumen:

Acil-Coenzima-A sintetasas de cadena larga (ACSLs) como biomarcadores cito-serológicos de enfermedades inflamatorias o autoinmunes.

Uso de las Acil-Coenzima-A sintetasas de cadena larga (ACSL) como biomarcadores cito-serológicos de enfermedades inflamatorias o autoinmunes, y especialmente de lupus eritematoso sistémico, y método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y seguimiento de dichas enfermedades.

ES 2 368 293 A1

DESCRIPCIÓN

Acil Coenzima-A sintetasas de cadena larga (ACSLs) como biomarcadores cito-serológicos en enfermedades inflamatorias o autoinmunes.

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología molecular y la medicina, y se refiere al uso de las Acil-Coenzima-A sintetasas de cadena larga (ACSL) como biomarcadores cito-serológicos de enfermedades inflamatorias o autoinmunes, y especialmente de lupus eritematoso sistémico.

10 Estado de la técnica anterior

Las Acil-Coenzima A sintetasas de cadena larga (ACSLs), son enzimas intracelulares constituidas por las isoenzimas ACSL1, ACSL2 (ahora denominada ACSL6) ACSL3, ACSL4 y ACSL5. Activan los ácidos grasos de cadena larga (12 a 22 C) mediante la ligación del Coenzima A (CoA) como primera etapa esencial para su posterior utilización en la síntesis de lípidos y en su degradación así como en la obtención de energía mediante beta-oxidación, regulación y señalización (Bu *et al.*, 2009. *J Biol Chem.* 2009 Sep 8) (Digel *et al.*, 2008. *Mol Cell Biochem.* 2009 Jun; 326(1-2):23-8) (Soupeine & Kuypers 2008. *Exp Biol Med* (Maywood). May; 233(5):507-21) (Webster *et al.*, 2008. *Endocrinology.* Jul; 149(7):3679-87) (Watkins *et al.*, 2007. *J Lipid Res.* 2007 Dec; 48(12):2736-50) (Cano *et al.*, 2006. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006 Jun; 99(4-5):197-202) (Yeh *et al.*, 2006. *Cancer Lett.* Feb 28; 233(2):297-308).

El metabolismo de los lípidos y de los ácidos grasos de cadena larga y las acil-CoA sintetasas se están vinculando a diversas enfermedades y procesos fisiológicos importantes en patogénesis, entre ellas cáncer (Mashima *et al.*, 2009. *Cancer Sci.* 100(8):1556-62) (Celis *et al.*, 2009. *Mol Oncol.* Feb 3) (Tomoda 1991. *Arch Exp Med.* Apr; 65 Suppl:1-12), apoptosis (Gassler *et al.*, 2007. *Gastroenterology.* 2007 Aug; 133(2):587-98) (Heimli *et al.*, 2003. *Lipids.* Mar; 38(3):263-8), inflamación (Westerbacka 2007) (Ciapaite *et al.*, 2006. *Biochim Biophys Acta.* Feb; 1771 (2):147-54), enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis (Brown *et al.*, 2007. *Curr Atheroscler Rep.* Dec; 9(6):494-500), obesidad (Teng *et al.*, 2009. *FASEB J.* Jun; 23(6):1705-9) (Lobo *et al.*, 2009. *J Biol Chem.* 2009 Jul 3; 284(27):18347-56), diabetes (Wendel *et al.*, Diabetes. 2010 Mar 3. PubMed electronic pub in advance) (Gu *et al.*, 2009. *PLoS One.* Jun 2; 4(6):e5767), enfermedades del sistema nervioso central (SNC) (McGuinness & Smith. 1999. *Arch Immunol Ther Exp* (Warsz). 1999; 47(5):281-7.) (Song *et al.*, 2007. *J Neurosci Res.* Dec; 85(16):3586-97) (Mirnic K 2006.) (Rapoport, 2008) (Lee *et al.*, 2007. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* Nov-Dec; 77(5-6):239-46. Epub 2007 Nov 26. Review), enfermedad celiaca (Gassler *et al.*, 2007. *Gastroenterology.* Aug; 133(2):587-98. Epub 2007 Jun 8) (Obermuller *et al.*, 2006. *Int J Colorectal Dis.* Mar; 21 (2):130-4. Epub 2005 Apr 5), fallo ovárico prematuro (Kang *et al.*, 2008. Epub 2008 Jun 13). Las ACSLs también han sido recientemente implicadas en arteriosclerosis (Askari *et al.*, 2007. *Diabetes.* Apr; 56(4):1143-52. Epub 2007 Jan 26) y complicaciones cardiovasculares (Matsuda *et al.*, 2008. *J Antibiot* (Tokyo). May; 61 (5):318-21), lo cual es interesante porque conecta con LES ya que estas complicaciones son altamente frecuentes en LES. Por lo cual, las proteínas implicadas en la captación de ácidos grasos y su metabolismo pueden ser importantes dianas farmacéuticas.

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune sistémica que la sufren principalmente mujeres jóvenes y tiene el potencial de afectar clínicamente a todos los sistemas de órganos (D'Cruz *et al.* 2007. *Lancet* 369 (9561):587-96). Estos incluyen típicamente un sarpullido eritematoso facial con una distribución de tipo "mariposa" encima de la nariz y las mejillas (erupciones cutáneas). La artritis y la artralgia que normalmente afectan a la mayoría las articulaciones falangianas y carpianas se observan en una mayoría de pacientes de LES (dolor de articulaciones). Asimismo, se observa una complicación renal en aproximadamente el 70% de pacientes de SLE, y se considera una de las principales causas de mortandad del LSE. La glomerulonefritis secundaria a la deposición del complejo antígeno-autoanticuerpo en el riñón a menudo lleva al deterioro renal, como se observa por la proteinuria, o en última instancia al fracaso renal. Las presentaciones clínicas normalmente incluyen hematuria o proteinuria asintomáticas, síndromes nefríticos o nefróticos agudos, glomerulonefritis progresiva rápida e insuficiencia renal crónica. También se observan manifestaciones clínicas del LES en los sistemas linfático, pulmonar, gastrointestinal, hémico, cardiovascular y nervioso central (SNC) (Jain & Halusca 2009. *J Clin Pathol.* 2009 Jul; 62(7):584-92) (Guillevin 2009. *Rheumatology* (Oxford). 48 Suppl 3:iii54-7) (Greenberg 2009. *Neurologist* 15(3):115-21) (Buyon *et al.*, 2009. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 5(3):139-48) (Seshan *et al.*, 2009. *Arch Pathol Lab Med.* 133(2):233-48) (Ryan 2009. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 296(4):R1258-67).

El tratamiento actual del LES depende de la localización y la gravedad de la enfermedad, estando el método de tratamiento a menudo dictado por el sistema de órganos afectado (Tuthill and Khamashta 2009. *J Autoimmun.* Sep; 33(2):92-8. Epub 2009 Jun 25. Review). Las artritis o las artralgias pueden controlarse a menudo con aspirina u otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos. Las manifestaciones más graves del LES, tales como la anemia hemolítica, la púrpura trombocitopénica y lapoliserositis grave se han tratado con prednisona. El tratamiento actualmente recomendado para el deterioro renal utiliza combinaciones de prednisona con agentes inmunosupresores tales como la azatioprina o la ciclofosfamida. Muy buenos resultados se están obteniendo con tratamientos biológicos dirigidos contra las células B (Levesque 2009. *Clin Exp Immunol.* Aug; 157(2):198-208. Review; D'Cruz *et al.*, 2007. *Lancet.* 2007 Feb 17; 369(9561):587-96. Review).

Los tratamientos actuales han abordado el lupus nefrítico, aunque los regímenes terapéuticos usados habitualmente son potencialmente tóxicos y pueden ser ineficaces en algunos pacientes de alto riesgo. Normalmente se prescriben regímenes inmunosupresivos intensivos. Para el LES severo, se usan inmunosupresivos tales como quimioterapias y

ciclosporina. Otros tratamientos incluyen el tratamiento con corticosteroides y con fármacos citotóxicos. Las terapias alternativas incluyen el tratamiento con ciclofosfamida y con prednisona. Los efectos secundarios del uso a largo plazo de prednisona incluyen el desarrollo de presión sanguínea elevada, de diabetes y de osteoporosis. Actualmente, varias compañías farmacéuticas están aplicando terapias biológicas como terapia anticitocinas, como bloqueadores del TNF- α , bloqueadores de IL1, IL6 e IL10; también muy importante es la terapia dirigida contra los linfocitos B como anticuerpos anti-CD20 (Rituximab, ocrelizumab) (D' Cruz *et al.*, 2007. *Lancet* 369(9561):587-96).

El pronóstico de los pacientes con LES ha mejorado en las últimas cuatro décadas, paralelo a los más importantes avances en el diagnóstico y tratamiento, así como a nuestro entendimiento del proceso fisiopatológico y su expresión clínica. No existe una prueba inequívoca para el diagnóstico del lupus, con lo que se basa en la clínica y en los hallazgos analíticos (Yee *et al.*, 2009. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 23(4):457-67).

La presencia de compromiso visceral-orgánico principal como el SNC y más consistentemente enfermedad renal se ha asociado con mal pronóstico. Adicionalmente, hay un mayor riesgo de progresión a enfermedad renal terminal cuando en la patología se encuentran lesiones vasculares. La trombocitopenia implica mal pronóstico en varios estudios, en especial cuando es una manifestación aguda. La hipertensión ha sido identificada como un factor de riesgo para mortalidad en LES, aunque puede ser parte de manifestaciones tardías no relacionadas con actividad de la enfermedad. Síndrome metabólico y arteriosclerosis se incrementan especialmente en LES (Sabio *et al.*, 2009. *J Rheumatol* 36(10):2204-11),

Los criterios de la ACR (American College of Rheumatology) tienen una sensibilidad de 96% y especificidad de 96%. La actividad global al inicio de la enfermedad como predictor de mortalidad, es un factor recientemente estudiado con el advenimiento de los diferentes índices (SLEDAI, LAI, SLAM, BILAG) y daño orgánico SLICC/ACR Damage Index (SDI) validados para medir de manera reproducible y confiable el grado de actividad de la enfermedad. Varios estudios han documentado el grado de actividad medido por SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Diseases Activity Index*) como índice de actividad y factor de mal pronóstico para mortalidad al presentarse con el inicio de la enfermedad en una clínica de Lupus o al momento de la biopsia renal inicial.

Normalmente, los pacientes de LES presentan niveles elevados en suero de autoanticuerpos contra constituyentes nucleares. La elevación del anticuerpo antinuclear (ANA) a títulos de 1:40 o superiores es el criterio diagnóstico más sensible. Más del 99% de pacientes con lupus tienen una elevación de ANA. Aunque una proporción significativa de pacientes puede tener ANA negativos al inicio de la enfermedad. Los principales antígenos de los anticuerpos producidos en pacientes con LES incluyen complejos proteína-ácido nucleico, tales como cromatina, las partículas de ribonucleoproteína nuclear pequeña Sm y U1 (snRNP) y los complejos Ro/SSA y La/SSB RNP es decir, anticuerpos antinucleares, particularmente el ADN bicatenario, y la patología mediada por inmunocomplejos (Yang 2009. *Rheumatology (Oxford)*. 48(9):1083-7). Los anticuerpos antinucleares testados y los anticuerpos antinucleares anti-ENA forman el pilar principal de un estudio serológico para lupus. También se detectan autoanticuerpos de fosfolípidos y de moléculas de la superficie celular. Los anticuerpos antifosfolípidos pueden predisponer a la trombosis. Más específico es el anticuerpo anti-smith. Los complejos autoanticuerpos nucleares con sus antígenos respectivos, que se depositan subsiguientemente en los vasos sanguíneos pequeños, es una causa directa de muchas de las manifestaciones clínicas del LES. Otros estudios rutinarios efectuados en presuntos LES son los niveles del sistema del complemento (niveles bajos sugieren consumo por parte del sistema inmunitario, electrolitos y función renal (trastornada si el riñón está afectado), enzimas del hígado y un recuento completo de la sangre. Se han encontrado evidencias que sugieren que el LES puede tener incidencia en el cáncer de pulmón y cáncer de testículo.

Sin embargo muy pocos biomarcadores en lupus han sido validados y empleados para tomar decisiones clínicas. La falta de biomarcadores fiables, específicos para lupus empeora el adecuado manejo clínico del LES e impide el desarrollo de nuevas terapias para lupus lo cual hace que la búsqueda de biomarcadores que reflejen con precisión la patofisiología y los cambios clínicos. De momento varios marcadores de laboratorio han demostrado promesa para la susceptibilidad al lupus, diagnóstico y seguimiento. Estos incluyen ciertos polimorfismos de tipo SNP y de variación de copia (CNV) de los genes del complemento C4 y del receptor Fc γ (susceptibilidad a la enfermedad), C4d unido a eritrocitos (Yang 2009 *Rheumatology (Oxford)*. 48(9):1083-7) el cual está más elevado en LES y específicamente en lupus con anemia hemolítica. No correlaciona con el SLEDAI ni con otros marcadores de actividad de la enfermedad como anti-dsDNA, C3 y C4. Por lo tanto tiene un valor limitado. Células plasmáticas CD27 (high) (actividad de la enfermedad), firma de interferón (actividad de la enfermedad) y anti-C1q y anti-NMDA (actividad de la enfermedad e implicación de órgano -SNC-). Todos estos biomarcadores tienen que ser todavía validados en estudios rigurosos y a gran escala en poblaciones diferentes (Liu & Ahearn 2009. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 23(4):507-23).

Para diagnosticar lupus nefritis se requiere actualmente una biopsia. Sin embargo es una técnica invasiva no recomendable con la clínica diaria. Se necesitaría un biomarcador que esté implicado en la patogénesis de LN. Hay candidatos que no están de momento totalmente consolidados: CCL2 (chemokine ligand 2; también conocido como MCP-1); CCL5 (chemokine ligand 5; también conocido como RANTES); y CX3CL1 (chemokine ligand 1; también conocido como fractalkine); IP-10 (interferon-inducible protein 10; también conocido como chemokine ligand 10); neutrophil gelatinase associate lipocalin; hepcidin; adiponectin; transferrin; ceruloplasmin; lipocalin-like prostaglandin synthetase-D; y orosomucoid (Das L).

Actualmente han sido validadas varias escalas para medir la actividad del LES, como el SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Activity Index*), BILAG (*British Isles Lupus Assessment Group*), SLAM (*Systemic Lupus Activity Mea-*

sure), ECLAM (*European Consensus Lupus Activity Measure*), LAI (*Lupus Activity Index*), que están mostrados una buena correlación entre ellas (Ward *et al.*, 2000. *J. Rheumatol* 27: 664-670). Junto a los diferentes índices (SLEDAI, LAI, SLAM, BILAG) y daño orgánico (SLICC/ACR -*Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index*, Gladman *et al.*, 1996. *Arthritis Rheum.* 39 (3): 363-369). Con el advenimiento de los diferentes índices y el daño orgánico, los predictores de mortalidad son factores recientemente estudiados.

Es necesario, por tanto, encontrar un método alternativo de diagnóstico, menos invasivo, que permita el diagnóstico de enfermedades inflamatorias o autoinmunes complejas, es decir, que son causadas por numerosos factores, y preferiblemente, que permitan el diagnóstico del lupus eritematoso sistémico (LES), y la subclasificación de los individuos afectados por dicha enfermedad en función de sus manifestaciones clínicas y predictores de mortalidad.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de enfermedades inflamatorias o autoinmunes, y entre ellas del lupus eritematoso sistémico (LES), permitiendo además la pronta identificación de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas de lupus y el establecimiento de grupos de pacientes en combinación con dichas manifestaciones clínicas, así como la evaluación de la respuesta al tratamiento de dichas enfermedades.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de los genes de la familia de las Acil-Coenzima A sintetasas de cadena larga (*ACSLs*) o sus productos de expresión, como marcadores para el diagnóstico, pronóstico, o seguimiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes. En una realización preferida, la enfermedad inflamatoria o autoinmune se selecciona de la lista que comprende: Lupus eritematoso sistémico (LES), Artritis reumatoide (AR), Arteriosclerosis (AS), Hipertensión (HT), Diabetes no insulina dependiente tipo 2 (T2D), Síndrome metabólico (incluye varias de las mencionadas), enfermedad de Crohn, o cualquiera de sus combinaciones. En otra realización más preferida, la enfermedad inflamatoria o autoinmune es el lupus eritematoso sistémico (LES).

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes, de ahora en adelante método de la invención, que comprende:

- a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y
- b) cuantificar el producto de expresión de, al menos, uno de los genes de la familia de las Acil-Coenzima A sintetasas de cadena larga (*ACSLs*) en la muestra biológica aislada de (a).

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

- c) comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia.

La cantidad de referencia se obtiene a partir de los valores de expresión constitutiva del gen, en un grupo de pacientes sanos. Los pasos (b) y/o (c) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (b) o la comparación computerizada en el paso (c).

En otra realización preferida de este aspecto de la invención la muestra biológica aislada de un individuo del paso (a) comprende células de sangre periférica (*peripheral blood mononuclear cells* PBMCs).

En esta memoria se entiende por célula mononuclear de sangre periférica (PBMC) una célula sanguínea caracterizada por poseer un único núcleo redondo, como los linfocitos, los monocitos o los macrófagos. Estas células sanguíneas son un componente crítico en el sistema inmune, concretamente para combatir las infecciones. La población de linfocitos está formada por células T (CD4 y CD8 positivas $\approx 75\%$).

Estas células se obtienen a menudo de la sangre usando ficol, un polisacárido hidrofílico que separa capas de la sangre, con monocitos y linfocitos formando un *buffy coat* bajo la capa del plasma. Este *buffy* contiene las PBMCs. Existen otros métodos de extracción conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo, extraerlas a partir de la sangre total con una solución de lisis hipotónica que preferiblemente lisa las células rojas sanguíneas. Este método da lugar a neutrófilos y otras células polimorfonucleares (PMN) importantes en la defensa inmune innata.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención los genes de la familia de las *ACSLs* se seleccionan de la lista que comprende: *ACSL1*, *ACSL6* (*ACSL2*), *ACSL3*, *ACSL4*, *ACSL5*, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida, la enfermedad inflamatoria o autoinmune se selecciona de la lista que comprende: lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR), arteriosclerosis (AS), hipertensión (HT), diabetes no insulina dependiente tipo 2 (T2D), síndrome metabólico (incluye varias de las mencionadas), enfermedad de Crohn, o cualquiera de sus combinaciones. En otra realización aún más preferida, la enfermedad inflamatoria o autoinmune es el lupus eritematoso sistémico (LES).

El término “diagnóstico”, tal y como se utiliza en la presente invención, a la capacidad de discriminar entre individuos afectados o no por una enfermedad inflamatoria o autoinmune. Preferiblemente la enfermedad inflamatoria o autoinmune es la artritis reumatoide (AR), la arteriosclerosis (AS), la hipertensión (HT), la diabetes no insulina dependiente tipo 2 (T2D), el síndrome metabólico, la enfermedad de Crohn, o cualquiera de sus combinaciones. Aún más preferiblemente, es el lupus eritematoso sistémico (LES). También se refiere, pero sin limitarnos, a la capacidad de discriminar entre muestras procedentes de pacientes que presentan diferentes estados de lupus eritematoso sistémico (LES). A su vez, atendiendo al método de la presente invención, se podrían establecer otras subclasificaciones dentro de esta principal, facilitando, por tanto, la elección y el establecimiento de regímenes terapéuticos adecuados. Esta discriminación tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es estadísticamente significativa puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor significación P, test de Student o funciones discriminantes de Fisher, medidas no paramétricas de Mann Whitney, correlación de Spearman, regresión logística, regresión lineal, área bajo la curva de ROC (AUC). Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad de forma diferencial en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80%, o en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

Una “muestra biológica aislada” incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Preferiblemente, la muestra biológica aislada comprende células mononucleares de sangre periférica (*peripheral blood mononuclear cells* PBMCs).

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

ACSL1 (*acyl-CoA synthetase long-chain family member 1*), es una isoenzima de la familia de las Acil-Coenzima A sintetasas de cadena larga. Aunque difieren en la especificidad de su sustrato, localización subcelular, y distribución tisular, todas las isoenzimas de esta familia convierten los ácidos grasos de cadena larga en Acil-CoA ésteres de ácidos grasos, y, por tanto, juegan un papel clave en la biosíntesis de los lípidos de membrana y en la degradación de los ácidos grasos por beta-oxidación. También se denomina *fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 1; fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 2; lignoceroyl-CoA synthase; long-chain acyl-CoA synthetase 1; long-chain acyl-CoA synthetase 2; long-chain fatty-acid-coenzyme A ligase 1; palmitoyl-CoA ligase 2; paltimoyl-CoA ligase 1*. Se localiza en el cromosoma 4 (4q34-q35). Otras abreviaturas son: ACS1; LACS; FAFL1; FAFL2; LACS1; LACS2. Su secuencia aminoacídica se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP_001986.2; y/o en la SEQ ID NO: 1.

En el contexto de la presente invención, *ACSL1* se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 1, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida en condiciones astringentes con la secuencia polinucleotídica de (a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de (a) o (b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 1, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína ACSL1.

ACSL6 (*ACSL2*) (*acyl-CoA synthetase long-chain family member 6l* (EC 6.2.1.3)), es una isoenzima de la familia de las Acil-Coenzima A sintetasas de cadena larga que se denomina también *fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 6; long fatty acyl-CoA synthetase 2; long-chain acyl-CoA synthetase 6*. Se localiza en el cromosoma 5 (5q31). Otras abreviaturas son: ACS2; FAFL6; LACS2; LACS5; FLJ16173; KIAA0837. Su secuencia aminoacídica se encuentra con número de acceso en el Gen Bank (NCBI) NP_056071.2; NP_001009185.1 y/o en la SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3, isoforma a/isoforma b, entre otros con homología indicada.

En el contexto de la presente invención, *ACSL6* se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3,

ES 2 368 293 A1

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida en condiciones astringentes con la secuencia polinucleotídica de (a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de (a) o (b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína ACSL6.

ACSL3 (*acyl-CoA synthetase long-chain family member 3*), es otra isoenzima de la familia de las Acil-Coenzima A sintetasas de cadena larga que también se denomina *fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 3; lignoceroyl-CoA synthase*. Se localiza en el cromosoma 2 (2q34-q35). Otras abreviaturas son: *ACS3, FAFL3, PRO2194*. Se expresa de manera notable en el cerebro y preferiblemente utiliza miristato, araquidonato, y eicosapentaenoato como sustratos. La secuencia de aminoácidos de esta isoenzima es un 92% idéntica a la de su homólogo en rata. Se han encontrado dos transcritos que codifican este gen. Su secuencia aminoacídica se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP_004448.2 y/o en la SEQ ID NO: 4.

En el contexto de la presente invención, *ACSL3* se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 4, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 4,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida en condiciones astringentes con la secuencia polinucleotídica de (a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de (a) o (b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 4, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína ACSL3.

ACSL4 (*acyl-CoA synthetase long-chain family member 4*), es otra isoenzima de la familia de las Acil-Coenzima A sintetasas de cadena larga que también se denomina: *acyl-CoA synthetase 4; fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 4; lignoceroyl-CoA synthase; long-chain fatty-acid-Coenzyme A ligase 4*. Se localiza en el cromosoma X (Xq22.3-q23). Otras abreviaturas son: *ACS4, FAFL4, LACS4, MRX63, MRX68*. Esta enzima emplea como sustrato araquidonato, preferiblemente. La ausencia de este enzima puede contribuir al retardo mental o síndrome de Alport. El splicing alternativo de este gen genera 2 transcritos. Su secuencia aminoacídica se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP_004449.1; NP_0765266.1 y/o en la SEQ ID NO: 5 (isoforma 1), SEQ ID NO: 6 (isoforma 2).

En el contexto de la presente invención, *ACSL4* se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida en condiciones astringentes con la secuencia polinucleotídica de (a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de (a) o (b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína ACSL4.

ACSL5 (*acyl-CoA synthetase long-chain family member 5*), es otra isoenzima de la familia de las Acil-Coenzima A sintetasas de cadena larga que también se denomina: *FAFL5 por fatty acid coenzyme A ligase 5; fatty acid coenzyme A ligase 5; fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 5; long-chain acyl-CoA synthetase 5; long-chain fatty acid coenzyme A ligase 5*. Se localiza en el cromosoma 10 (10q25.1-q25.2). Otras abreviaturas son: *RP11-32402.5, ACS2, ACS5, FAFL5*. Esta isoenzima se expresa abundantemente en el útero y en el bazo, y en cantidades traza en el cerebro

ES 2 368 293 A1

normal, pero presenta niveles elevados en gliomas malignos. Este gen interviene en el crecimiento celular de los gliomas mediado por los ácidos grasos. Se han encontrado tres transcritos codificando dos isoformas para este gen. Su secuencia aminoacídica se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP_976313.1; NP_057318.2 y/o en la SEQ ID NO: 7 (isoforma b), SEQ ID NO: 8 (isoforma a).

5

En el contexto de la presente invención, *ACSL5* se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 7, o la SEQ ID NO: 8, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

10 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 7, o la SEQ ID NO: 8,

15 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida en condiciones astringentes con la secuencia polinucleotídica de (a),

15 c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de (a) o (b) debido a la degeneración del código genético,

20 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 7, o la SEQ ID NO: 8, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína *ACSL5*.

25 La detección de la cantidad del producto de expresión de los genes seleccionados de la lista que comprende: *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5*, o cualquiera de sus combinaciones, puede realizarse por cualquier medio conocido en el estado de la técnica. Los autores de la presente invención han demostrado que la detección de la cantidad o la concentración de estos productos de expresión de manera semi-cuantitativa o cuantitativa permiten diferenciar entre los diferentes estadios del LES. De esta manera, se puede establecer un diagnóstico diferencial en individuos afectados por LES, que permite subclasificarlos.

30

La medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa, puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración del producto de expresión de los genes, basada en una señal que se obtiene directamente de los transcritos de dichos genes, o de las proteínas (enzimas *ACSL*), y que está correlacionada directamente con el número de moléculas de RNA o de proteínas producidas por los genes. Dicha señal - a la que también podemos referirnos como señal de intensidad - puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de dichos productos. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

35

40 El término “cantidad”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa de los productos de expresión de los genes, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con los mismos o que pueda derivarse de éstos. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de dichos productos de expresión obtenidos mediante medida directa. Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en otra parte del presente documento.

45

El término “comparación”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación de la cantidad de los productos de expresión de los genes *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5* de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una cantidad de los productos de expresión de los genes *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5* de una o varias muestras de referencia deseable descrita en otra parte de la presente descripción. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. La comparación descrita en el apartado (c) del método de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

50

55 El término “cantidad de referencia”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a la cantidad absoluta o relativa (al gen de referencia) de productos de expresión de los genes *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5* que permite discriminar un determinado estadio de LES de otros estadios, o de otras enfermedades. Las cantidades de referencia adecuadas pueden ser determinadas por el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia que puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. Así, por ejemplo pero sin limitarnos, la muestra de referencia pueden ser los controles negativos, esto es, las cantidades detectadas por el método de la invención en muestras de individuos que no padecen ninguna enfermedad inflamatoria o autoinmune, y más preferiblemente, que no padecen LES.

60

65 La cantidad de referencia será, por ejemplo, en el caso de la diferenciación entre los pacientes afectados por la enfermedad inflamatoria de los pacientes sanos, la expresión constitutiva del gen en un grupo control de pacientes sanos. Sin embargo, en el caso de la subclasificación de los pacientes afectados por lupus en función de sus manifestaciones, el grupo control estará formado por un grupo de enfermos con lupus que no tuvieron esa manifestación clínica.

ES 2 368 293 A1

Así pues, la muestra o muestras de referencia pueden ser, por ejemplo, obtenidas a partir del suero de un paciente con enfermedad inflamatoria o autoinmune, y más preferiblemente con un paciente de LES, en una determinada fase clínica. En otra realización preferida de este aspecto de la presente invención, la cantidad de referencia se obtiene a partir de una muestra de referencia. La cantidad de referencia puede obtenerse también, por ejemplo, de los límites de distribución normal de una cantidad encontrada en muestras obtenidas de una población de pacientes con la enfermedad inflamatoria o autoinmune de interés en distintas fases, mediante técnicas estadísticas bien conocidas. Preferiblemente, la enfermedad inflamatoria o autoinmune de interés es LES.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “variante” se refiere a una proteína sustancialmente homologa a cualquiera de las proteínas ACSL1, ACSL2, ACSL3, ACSL4, o ACSL5. En general, una variante incluye adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. El término “variante” incluye también a las proteínas resultantes de modificaciones postranslacionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación metilación o acilación.

Tal como aquí se utiliza, una proteína es “sustancialmente homologa” a cualquiera de las proteínas ACSL1, ACSL2, ACSL3, ACSL4, o ACSL5, cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, respectivamente a como se ha descrito anteriormente; es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, y SEQ ID NO: 8, de al menos, un 50%, típicamente de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferentemente de, al menos un 90%, más preferentemente de, al menos, un 95%, y, aún más preferentemente de, al menos, un 99%. Las secuencias homologas a cualquiera de las proteínas ACSL1, ACSL2, ACSL3, ACSL4, o ACSL5 pueden ser identificadas fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

La expresión “funcionalmente equivalente”, tal como aquí se utiliza, significa que las proteínas o el/los fragmento/s de la/s proteína/s en cuestión mantiene/n esencialmente las propiedades biológicas o inmunológicas descritas en este documento. Dicha capacidad se puede determinar mediante métodos convencionales.

En otra realización preferida, la detección de la cantidad de cualquiera de las proteínas ACSL1, ACSL2, ACSL3, ACSL4, o ACSL5 se realiza mediante un inmunoensayo. El término “inmunoensayo”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier técnica analítica que se basa en la reacción de la conjugación de un anticuerpo con un antígeno. Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: *immunoblot*, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, x-map o *chips* de proteína.

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

El término “compuesto marcador”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de dar lugar a una señal cromogénica, fluorogénica, radiactiva y/o quimioluminiscente que permita la detección y cuantificación de la cantidad de anticuerpos frente a los antígenos ACSL1, ACSL2, ACSL3, ACSL4, y/o ACSL5. El compuesto marcador se selecciona de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa. Este compuesto marcador puede unirse al anticuerpo directamente, o a través de otro compuesto. Algunos ejemplos de compuestos marcadores que se unen directamente son, pero sin limitarse, enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, isótopos radiactivos como ^{32}P o ^{35}S , fluorocromos como fluoresceína o partículas metálicas, para su detección directa mediante colorimetría, auto-radiografía, fluorimetría, o metalografía respectivamente.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de diagnóstico de lupus eritematoso sistémico, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a)-(c) según el primer método de la invención, y que además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico cuando presenta una cantidad de producto de expresión de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: *ACSL1*, *ACSL3*, *ACSL5SI* o cualquiera de sus combinaciones, detectados en el paso (b) menor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia.

En otra realización preferida, el segundo método de la invención además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico cuando presenta una cantidad de producto de expresión de los genes *ACSL1A*, *ACSL1SI*, *ACSL2A*, *ACSL2SI*, *ACSL3SI*, *ACSL4SI*, *ACSL5*, o cualquiera de sus combinaciones, detectado en el paso (b) mayor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia (que se obtiene del grupo control sin lupus).

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el segundo método de la invención además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico con manifestaciones cutáneas cuando presenta una cantidad de producto de expresión de los genes que se seleccionan de

ES 2 368 293 A1

la lista que comprende: *ACSL1A*, *ACSL1SI*, *ACSL3SI*, o cualquiera de sus combinaciones, detectado en el paso (b) menor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia.

5 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el segundo método de la invención además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico con manifestaciones articulares cuando presenta una cantidad de producto de expresión del gen *ACSL4N* detectado en el paso (b) mayor, y (o simultáneamente) una cantidad de producto de expresión del gen *ACSL4SI* menor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia.

10 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el segundo método de la invención además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico con manifestaciones renales cuando presenta una cantidad de producto de expresión del gen *ACSL3SI* detectado en el paso (b) mayor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia.

15 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el segundo método de la invención además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico con manifestaciones hematológicas cuando presenta una cantidad de producto de expresión del gen *ACSL4SI* detectado en el paso (b) mayor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia.

20 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el segundo o el tercer método de la invención además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico con manifestaciones neurológicas cuando presenta una cantidad de producto de expresión del gen *ACSL4A* detectado en el paso (b) menor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia.

25 Actualmente han sido validadas varias escalas para medir la actividad del LES, como el SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Activity Index*), BILAG (*British Isles Lupus Assessment Group*), SLAM (*Systemic Lupus Activity Measure*), ECLAM (*European Consensus Lupus Activity Measure*), LAI (*Lupus Activity Index*), que están mostrando una buena correlación entre ellas (Ward *et al.*, 2000. *J. Rheumatol* 27: 664-670). Junto a los diferentes índices (SLEDAI, LAI, SLAM, BILAG) y daño orgánico (SLICC/ACR -*Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index*, Gladman *et al.*, 1996. *Arthritis Rheum.* 39 (3): 363-369).

30 Así pues, a cantidad de referencia puede obtenerse también, por ejemplo, de los límites de distribución normal de una cantidad encontrada en muestras obtenidas de una población de pacientes con una enfermedad inflamatoria o autoinmune, y preferiblemente con LES, en distintas fases o con distintas manifestaciones clínicas, mediante técnicas estadísticas bien conocidas.

Se entiende por “perfil de expresión génica” el perfil génico obtenido tras la cuantificación del ARNm y/o de proteína producida por los genes de interés o biomarcadores, es decir, por los genes *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5*, en una muestra biológica aislada. El perfil de expresión de los genes se realiza, preferiblemente, determinando el nivel de ARNm derivado de su transcripción, previa extracción del ARN total presente en la muestra biológica aislada, lo cual puede realizarse mediante protocolos conocidos en el estado de la técnica. La determinación del nivel de ARNm derivado de la transcripción de los genes *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5*, puede realizarse, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), RT-PCR cuantitativa, retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR), o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos; análisis en serie de la expresión génica (SAGE, SuperSAGE); chips de ADN elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo; *microarrays* de ADN elaborados con oligonucleótidos sintetizados *in situ* mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo; hibridación *in situ* utilizando sondas específicas marcadas con cualquier método de marcaje; mediante geles de electroforesis; mediante transferencia a membrana e hibridación con una sonda específica; mediante resonancia magnética nuclear o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen utilizando nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio. El perfil de expresión génica también podría obtenerse mediante la detección y/o cuantificación de las proteínas producto de la traducción del ARNm derivado de la transcripción de los genes *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5*, mediante por ejemplo, pero sin limitarnos, inmunodetección por *western blot*.

55 La detección cuantitativa de la expresión de los genes *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5* puede realizarse más preferiblemente mediante PCR en tiempo real (RT-PCR ó RTqPCR). La detección en tiempo real de los productos amplificados puede llevarse a cabo mediante la utilización de moléculas fluorescentes que se intercalan en el ADN de cadena doble o mediante hibridación con diferentes tipos de sondas. Así, en otra realización preferida, la expresión de los genes *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5* se detecta mediante RTqPCR empleando los cebadores SEQ ID NO: 11-SEQ ID NO: 23, indicados en la Tabla 1.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante kit de la invención, que comprende los elementos necesarios para analizar los productos de expresión de, al menos uno, preferiblemente dos, más preferiblemente tres, más preferiblemente cuatro, y aún más preferiblemente los cinco genes *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5* en la muestra obtenida en el paso (a). Más preferiblemente comprende los medios necesarios para comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

ES 2 368 293 A1

Aún más preferiblemente, el kit de la presente invención comprende los elementos necesarios para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la presente invención.

Dicho kit puede contener todos aquellos reactivos necesarios para analizar la cantidad del producto de expresión de, al menos, uno de los genes seleccionados de la lista que comprende: *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5*, en la muestra biológica aislada, por medio de cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento como, por ejemplo, pero sin limitarse, cebadores, sondas y todos aquellos reactivos necesarios para determinar la expresión de la proteína *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5*. Más preferiblemente, el kit comprende al menos una pareja de los cebadores que se recogen en la Tabla 1. (SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13/SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15/SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17/SEQ ID NO: 18 ó SEQ ID NO: 19/SEQ ID NO: 20.). El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, el uso de tampones, polimerasas, cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, agentes para prevenir la contaminación, etc.

En otra realización preferida, el kit de la invención comprende anticuerpos específicos de la proteína *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5*, anticuerpos secundarios o controles positivos y/o negativos. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc. En el caso de la detección por RTqPCR puede contener, pero sin limitarse.

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

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

Otro aspecto se refiere al uso del kit de la invención, para el diagnóstico, pronóstico, o seguimiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes. En una realización preferida, el kit comprenden una pareja de cebadores que se selecciona de la lista que comprende: SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 12, par SEQ ID NO: 13/SEQ ID NO: 14; par SEQ ID NO: 15/SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: par SEQ ID NO: 17/SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19/SEQ ID NO: 20, o cualquiera de sus combinaciones. En otra realización preferida, la enfermedad inflamatoria o autoinmune se selecciona de la lista que comprende: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, arteriosclerosis, hipertensión, diabetes no insulina dependiente tipo 2, síndrome metabólico, enfermedad de Crohn, o cualquiera de sus combinaciones. En una realización aún más preferida, la enfermedad inflamatoria o autoinmune es el lupus eritematoso sistémico.

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

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

Ejemplos

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

Niveles de expresión de los mRNA codificantes de ACSLs en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y su asociación a LES

El objetivo de este estudio fue investigar el nivel de transcripción (relativo a un gen de referencia) de las isoformas *ACSL1*, 2, 3, 4, 5 en PBMC de 45 muestras de pacientes con LES y 35 controles sanos, mediante PCR cuantitativo a tiempo real, para su comparación y estudio de asociación.

Sujetos de estudio

Para realizar estas medidas se han utilizado 45 pacientes con LES que cumplían ≥ 4 criterios revisados por la “*American College of Rheumatology*” (ACR) (Tan *et al.*, 1982. *Arthritis Rheum* 25:1271) (ver siguiente apartado: Diagnóstico en LES) que fueron reclutados de la Unidad de enfermedades Autoinmunes del Hospital Virgen de las Nieves. Todos los participantes fueron de raza blanca, caucásicos. Se excluyó los pacientes con LES que no fuesen monitorizados durante al menos 1 año por dicha unidad, así como pacientes con sospecha de infección activa u otra enfermedad que implique inflamación sistémica, excepto LES, en el momento de la inclusión.. Todos los participantes

dieron consentimiento informado para participar en este estudio, el cual fue aprobado el comité de ética local. Los controles sanos proceden de donadores del banco de sangre de Granada, concretamente el material sanguíneo procede de las bolsas de sangre que se extraen rutinariamente, que pasan los test microbiológicos, pero no terminan de procesarse adecuadamente por defectos de volumen y constituyen bolsas de desecho.

5

Diagnóstico en LES

El diagnóstico del lupus eritematoso sistémico (LES) se basa en 11 criterios, de los cuales se requieren 4 o más de estos criterios, ya sea en secuencia o simultáneamente, durante cualquier intervalo de la observación. Estos criterios fueron publicados en 1982 por el comité de criterios diagnósticos y terapéuticos del “American College of Rheumatology” (ACR), y fueron revisados en 1992. Los criterios son los siguientes:

1. Erupción malar: Eritema fijo, plano o alto, sobre las eminencias malares, que no suele afectar los surcos nasogenianos.

2. Erupción discoide: Placas eritematosas altas, con descamación queratósica adherente y tapones foliculares; puede haber cicatrices atróficas en las lesiones más antiguas.

3. Fotosensibilidad: Erupción cutánea a causa de una reacción insólita a la luz solar, referida por el paciente u observada por el médico.

4. Úlceras bucales: Ulceración nasofaríngea, por lo común indolora, observada por un médico.

5. Artritis: Artritis no erosiva que afecta dos o más articulaciones periféricas, caracterizada por dolor a la palpación, tumefacción o derrame.

6. Serositis:

a. Pleuritis: Claro antecedente de dolor pleurítico o frote, o signos de derrame pleural, o bien

b. Pericarditis: comprobada por electrocardiograma o frote o signos de derrame pericárdico.

7. Trastorno renal:

a. Proteinuria persistente mayor a 0,5 g/día o mayor de 3+ sino se ha cuantificado, o bien

b. Cilindros celulares: pueden ser de eritrocitos, hemoglobina, granulares, tubulares o mixtos.

8. Trastorno neurológico:

a. Convulsiones: en ausencia de tratamientos farmacológicos o alteraciones metabólicas conocidas; por ej. Uremia, cetoacidosis, o desequilibrio electrolítico, o bien

b. Psicosis: en ausencia de tratamientos farmacológicos o alteraciones metabólicas conocidas; por ej. Uremia, cetoacidosis, o desequilibrio electrolítico.

9. Trastorno hematológico:

a. Anemia hemolítica: con reticulocitosis, o bien

b. Leucopenia: menos de 4.000/mm³ en dos o en más ocasiones

c. Linfopenia: menos de 1.500/mm³ en dos o más ocasiones, o bien

d. Trombocitopenia: menos de 100.000/mm³ en ausencia de fármacos que produzcan esta alteración.

10. Trastorno inmunitario:

a. Preparación de células LE-positivas (Este ítem fue eliminado de los criterios diagnósticos en la revisión realizada en 1992), o bien

b. Anti-DNA: título anormal de anticuerpos contra DNA nativo, o bien

c. Anti-Sm: Presencia de anticuerpos contra antígeno nuclear Sm.

ES 2 368 293 A1

d. Hallazgo positivo de Anticuerpos antifosfolipídicos (AFL) basado en:

1. Nivel sérico anormal de anticuerpos anticardiolopina IgG o IgM,
2. Resultado positivo para anticoagulante lúpico utilizando un método estándar, o
3. Falso positivo en pruebas serológicas de sífilis (VDRL), que persiste por lo menos durante 6 meses y se confirma por pruebas de *Treponema pallidum* o prueba de absorción de anticuerpo treponémico fluorescente (FTA-Abs).

11. Anticuerpo antinuclear: Un título anormal de ANA por inmunofluorescencia o análisis equivalente en cualquier momento y en ausencia de medicamentos relacionados con el síndrome de lupus de origen farmacológico.

Material para análisis

El material que se extrae de los pacientes es un volumen de 3 ml de sangre periférica con anticoagulante. La sangre es procesada por medio de centrifugación en gradiente de densidad. Concretamente se utilizó Histopaque 1077 de Sigma-Aldrich (referencia comercial 10771) siguiendo sus indicaciones técnicas (Sigma-Aldrich Inc., 3050 Spruce Street, St. Louis Mo 63103, USA) para obtener las células mononucleares de la sangre periféricas (siglas en inglés, PBMC, de *periferal blood mononuclear cells*) sin eritrocitos. Las PBMCs se procesan para obtener el RNA mediante el kit RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, cat. No. 74134. Quiagen es una marca comercial de AMBION, Inc., Austin, Texas). Dicho material se procesa para convertirlo en cDNA, mediante kits comerciales de conversión del RNA a cDNA que utilizan una enzima reverso transcriptasa, el material obtenido se denomina DNA complementario (cDNA), lo cual ya puede ser utilizado para su amplificación mediante termociclador a tiempo real (RT-PCR) que cuantificará las cantidades presentes de cDNA correspondiente a las diferentes isoenzimas de ACSLs. La cuantificación de estas moléculas se hace de manera relativa a la de la molécula de referencia de un gen de expresión constitutiva muy estable a lo largo del ciclo de la célula (UbcH5B) (Hamalainen *et al.*, 2001. *Anal Biochem.* Dec 1; 299(1):63-70). Los oligonucleótidos para la amplificación de cada ACSL se indican a continuación:

TABLA 1
Oligonucleótidos utilizados

ACSL isoforma	Primer sequence 5'→3'
ACSL1	Directo: SEQ ID NO: 9 Reverso: SEQ ID NO: 10
ACSL3	Directo: SEQ ID NO: 11 Reverso: SEQ ID NO: 12
ACSL4	Directo: SEQ ID NO: 13 Reverso: SEQ ID NO: 14
ACSL5	Directo: SEQ ID NO: 15 Reverso: SEQ ID NO: 16
ACSL6 (ACSL2)	Directo: SEQ ID NO: 17 Reverso: SEQ ID NO: 18
UbcH5B (gen de referencia)	Directo: SEQ ID NO: 19 Reverso: SEQ ID NO: 20

Estadística utilizada para el análisis de los datos

Los datos clínicos fueron recogidos en una base de datos creada en el programa estadístico SPSS para Windows, versión 15.0.

El análisis univariante de los valores que muestran las diferentes ACSLs, en dos grupos independientes (enfermos de lupus y controles sanos) se indica en la Tabla 2 como mediana con el rango intercuartílico. Se utilizó la prueba de Mann Whitney para determinar la significación estadística de las diferencias entre enfermos y controles. Para los análisis del efecto de las diferentes ACSL en lupus y determinar cuáles son las ACSL esenciales que describen mejor la probabilidad de lupus, se realizó regresión logística bimodal introduciendo como variables las diferentes series, esto es, la N, la A y la SI. Se indica en la tabla el coeficiente beta, la significación P y el efecto como odds ratio (OR) con 95% intervalo de confianza (95%IC). Igualmente, la regresión logística, se realizó con el grupo de enfermos de lupus para determinar los efectos de cada ACSL en las diferentes manifestaciones y criterios de diagnóstico de lupus. Se determinó al área bajo la curva (AUC) para determinar el valor predictivo de cada ACSL a partir de los datos de probabilidades de los diferentes modelos de regresión logística multivariada condicional para seleccionar las ACSL independientes. Para el análisis de correlación se realizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson (con dos colas) (r) y Spearman. Regresión lineal múltiple se realizó para relacionar cada ACSL con parámetros cuantitativos de suero en lupus que constituyen factores de inflamación. Se indica en las tablas el coeficiente de regresión Beta, la significación P, y el coeficiente de determinación R^2 , para determinar el % de variación de ese factor que explica una unidad de variación de la ACSL considerada.

Resultados

Estos resultados indican que las ACSLs están claramente involucradas en la patología del LES. Hemos cuantificado los niveles de los mRNA codificantes de las ACSLs de varias condiciones. La primera de ellas es en células recién extraídas de la sangre de pacientes con LES o controles sanos. Estos valores son indicativos de los niveles de las ACSLs en PBMC (linfocitos y monocitos) en las condiciones fisiológicas en las que se encuentran en los enfermos o controles (se denominan con número y letra N, de no tratadas *in vitro*). La ACSL3N tiene una mediana de 18 (13.0-29.7) en controles sanos frente a 10 (8.1-15.3) en los enfermos de lupus.

Como se puede apreciar en la Tabla 2, comparado con personas sanas, las PBMCs de LES recién extraídas de pacientes y sin ningún tratamiento activador adicional (células normales, N) tuvieron significativamente más bajo nivel de ACSL1N ($P=0.008$) y ACSL3N ($P=4.1 \times 10^{-4}$) pero fue mayor para ACSL5N ($P=3.4 \times 10^{-4}$).

La regresión logística multivariada de esta serie indica que las ACSL3N y 5N constituyen el mejor modelo predictivo de lupus, con un odds ratio (OR) de 0,83 para la 3N y de 1,14 para la 5N (Tabla 3). El área bajo la curva para este modelo es 0,888 que indica una alta capacidad diagnóstica de lupus (Tabla 4) frente a controles sanos.

Cuando se analizan estos factores mediante análisis de asociación no-paramétrica o correlación de Spearman, únicamente en el grupo de enfermos, en relación con diferentes manifestaciones que ocurren en lupus, concretamente, con los 11 criterios de diagnóstico clínico de lupus (ver Tabla 3 y Tabla 4), o con los índices de actividad, la ACSL2N correlaciona moderada e inversamente con el índice de daño orgánico acumulado crónico (SLICC/ACR Damage index) ($r=-0.314$, $P=0.048$), con los niveles de homocisteína, e IL-2. ACSL5N correlaciona con los niveles de IL6 que a su vez es un factor inflamatorio importante, y con la presencia de manifestaciones clínicas hematológicas (hemogl.= anemia hemolítica), e inversamente con el tratamiento de corticoides. De la misma manera, dentro del grupo de enfermos con LES, los niveles de ACSL5 correlacionan con el tratamiento de los pacientes con corticoides lo que sugiere que los tales niveles pueden estar afectados por dicho tratamiento.

Otra fuente de cuantificación de las ACSLs es a partir de PBMCs que han sido estimuladas en cultivo durante 24 horas con un potente activador celular y mitógeno (PMA + Ionomicina) (se denominan con número y letra A, de activadas). Los valores obtenidos en este caso para las distintas ACSLs son indicativos, más que del estatus del sistema inmunológico de las personas de las que proceden las muestras, del potencial máximo de respuesta de tales células. En este tipo de medida, sólo la ACSL1A y la 2A son significativamente diferentes. Así Los valores que van desde 47.8 a 71,5 son específicos de lupus. Para la 2A, los valores que van desde 0,28 hasta 0,6, que son la mayoría, se dan sólo en lupus. Se aprecia en la Tabla 2, que la expresión relativa fue más alta en LES frente a los controles para la ACSL1 (A) ($P=3.8 \times 10^{-4}$) y ACSL2A ($P=1.9 \times 10^{-5}$), quedando las otras sin cambiar significativamente con la activación de las PBMCs. La regresión logística indica que la 1A y la 5A son variables independientes que mejor explican la aparición de lupus (Tabla 3) y el área bajo la curva es de 0,918, reflejando una gran capacidad predictiva. Dentro del grupo de pacientes con LES y estratificando en base a tener o no tener alguna de las manifestaciones clínicas anteriormente indicadas (ver Tabla 2 y Tabla 3), la ACSL1A se asocia con el subgrupo que padece manifestaciones cutáneas ($P=0.019$), ACSL2A correlaciona moderada e inversamente tanto con el índice de actividad lúpica SLEDAI ($r=-0.375$, $P=0.017$) como con la proteína C reactiva (PCR, $r=-0.400$, $P=0.011$) factor ampliamente asociado al proceso inflamatorio en muchas enfermedades y procesos infecciosos.

Un parámetro que hemos establecido para equilibrar diferencias debidas a factores no visibles entre valores obtenidos de células normales y activadas, con PMA+I, de la misma muestra, y para que sean más extrapolares y similares a cuantificaciones realizadas en otros laboratorios e incluso en otras enfermedades o situaciones, es el índice de estimulación (stimulation index, SI). Stimulation index (SI), el cociente entre los niveles de ACSLs de PBMC activadas y normales fue significativamente mayor en LES para la ACSL1SI ($P=4.9 \times 10^{-7}$), ACSL2SI ($P=0.001$), ACSL3SI ($P=1.0 \times 10^{-6}$), y ACSL4SI ($P=0.013$), pero fue inferior para la ACSL5SI ($P=1.8 \times 10^{-5}$) como se muestra en la Tabla 1. Cuando se analizan estos valores dentro del grupo con lupus, estratificando como antes por tener o no tener una condición patológica determinada o por análisis de correlación (ver Tabla 3 y Tabla 4), encontramos que

ES 2 368 293 A1

ACSL1A, 1SI y 3SI se asocia con manifestaciones cutáneas (P=0.021) y complicaciones renales (P=0.017); ACSL3SI se asocia con manifestaciones cutáneas (P=0.019), complicaciones renales (P=0.002), y correlaciona inversamente con los niveles de PCR (r=-0.446, P=0.004). ACSL4SI se asocia con problemas articulares (P=0.003), renales (P=0.038), hematológicos (P=0.0034), y correlaciona inversamente con los niveles de PCR (r= - 0.316, P= 0.047). Las ACSL2SI y la ACSL5SI no mostraron asociación o correlación con ninguna manifestación patológica listada.

Conclusiones

Por lo tanto, sugerimos que los desequilibrios en la expresión de las diferentes ACSLs en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) en situación fisiológica (controles sanos) o patofisiológica (lupus) puede contribuir a la patogénesis del lupus, concretamente los valores de expresión de los genes de las ACSL1N, 3N, 4N, 1A, 2A, 1SI, 2SI, 3SI, 4SI y 5SI. Igualmente pueden contribuir según su nivel de expresión a las manifestaciones de eritemas faciales (ACSL1A, 5A), fotosensibilidad (ACSL1N), articulares (ACSL4SI), úlceras orales (ACSL5N), renales (ACSL3SI), hematológicas (ACSL4SI) y neurológicas (ACSL4A) y 0presencia de anticuerpos anti-DNA (ACSL1A) y que en conjunto, como sugerencia preliminar, las ACSLs pueden representar nuevas dianas para el tratamiento del lupus. Las medidas o cuantificaciones de las diferentes ACSLs pueden ser de utilidad como marcadores y en la pronta identificación de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas de lupus e indicar respuesta al tratamiento en pacientes con patología activa.

TABLA 2

Niveles de expresión relativa (mRNA) de las diferentes ACSLs en lupus y controles sanos. La cuantificación se realiza en células PBMCs sin tratar (serie N), *in vitro* activadas (serie A) y del ratio entre activadas/no activadas (A/N) denominado Stimulation index (SI). Los niveles relativos de ACSLs se presentan como la mediana (rango) y significación estadística de la diferencia de la comparación entre lupus y controles se realizada mediante la prueba de Mann-Whitney

ACSL	Controles sanos n = 35	Pacientes LES ^a n = 43	P _{M-W} ^b
<u>De PBMCs no tratadas (N)</u>			
1N	77.2 (37.3-110.0)	49.0(31.0-66.9)	0.008
2N	0.09 (0.03-0.18)	0.06(0.03-0.12)	NS
3N	18.0 (13.0-29.7)	10.0(8.1-15.3)	4.1 x 10 ⁻⁴
4N	1.6 (0.6-3.5)	1.6 (0.7-2.3)	NS
5N	15.3 (9.3-20.0)	24.7(16.8-43.3)	3.4 x 10 ⁻⁴
<u>De PBMCs activadas (A)</u>			
1A	30.2 (20.2-47.8)	55.3(30.7-71.5)	3.8 x 10 ⁻⁴
2A	0.09 (0.01-0.28)	0.4(0.2-0.6)	1.9 x 10 ⁻⁵
3A	20.5 (12.0-33.8)	22.3(18.8-29.5)	N.S.
4A	2.9 (1.1-4.4)	3.1(1.6-4.1)	N.S.
5A	72.7 (33.2-128.3)	52.9(33.7-75.8)	N.S.
<u>Stimulation index (SI = A/N)</u>			

ES 2 368 293 A1

1SI	0.46 (0.27-0.66)	1.1(0.6-1.7)	$4.9 \times 10 e^{-7}$
2SI	1.09 (0.00-5.12)	5.9(1.9-9.6)	0.001
3SI	1.18 (0.79-1.55)	2.1(1.7-3.0)	$1.0 \times 10 e^{-6}$
4SI	1.3 (0.71-2.43)	2.2(1.4-3.0)	0.013
5SI	5.1 (2.5-6.8)	1.9(1.2-3.4)	$1.8 \times 10 e^{-5}$

TABLA 3

Regresión logística para delimitar las variables ACSL independientes que explican mejor la probabilidad de tener lupus. Se ajusta un modelo para cada serie (N, A y SI). Se indica el coeficiente beta, la significación P y el OR con el 95% intervalo de confianza

ACSL	Beta	P	OR, (95% CI)
<u>De PBMCs^a no tratadas (N)</u>			
3N	-0.177	$2.45 \times 10e-5$	0.838 (0.772-0.910)
5N	0.136	$6.8 \times 10e-5$	1.146 (1.072-1.226)
<u>De PBMCs^b in vitro activadas (A)</u>			
1A	0.125	$6.17 \times 10e-5$	1.13 (1.066-1.205)
5A	-0.043	$1.18 \times 10e-5$	0.958 (0.937- 0.979)
<u>Stimulation index (SI = A/N)^c</u>			
1SI	3.44	0.005	31,2 (2.9-336)
3SI	1.096	0.017	2.99 (1.2-7.37)
5SI	-0.773	0.001	0.46 (0.29-0.72)

a) Variables incluidas en el modelo: ACSL1N, 2N, 3N, 4N, 5N.

b) Variables incluidas en de modelo: ACSL1A, 2A, 3A, 4A, 5A.

c) Variables incluidas en el modelo: ACSL1SI, 2SI, 3SI, 4SI, 5SI.

TABLA 4

Área bajo la curva (AUC) de los diferentes modelos de regresión logística

ACSL	AUC (95% CI)	EE	P
3N, 5N	0,888 (0,814-0,961)	0,037	$4,3 \times 10^{-9}$
1A, 5A	0,918 (0,858-0,978)	0,031	$2,5 \times 10^{-10}$
1SI, 3SI, 5SI	0,931 (0,879-0,983)	0,027	$6,7 \times 10^{-11}$

AUC, área bajo la curva; EE, error estándar; P, probabilidad.

ES 2 368 293 A1

TABLA 5

Análisis de asociación y cantidad expresión de las diferentes ACSL entre los grupos que tienen (si) y que no tienen (no) la manifestación lúpica indicada con el número de muestras en cada grupo. Se indica además en la línea inferior de cada ACSL la significación P. No significativo se indica con "n.s". Estadística: se utiliza contraste no paramétrico para 2 grupos independientes y variable dependiente ordinal (afectaciones clínicas 0= no, 1 = si) con la prueba de Mann Whitney

ACSL QUE MUESTRAN ASOCIACIÓN							
AFECTACIONES EN LUPUS	1A	1SI	3SI	4N	4A	4SI	5SI
ERITEMA FACIAL no=10 / si =30							27 / 18,2 P=0,032
CUTÁNEO no=26 / si =14	23,6 / 14,6 P=0.019	23,6 / 14,7 P=0,022	23,6 / 14,7 P=0,019				
FOTOSENSIBILIDAD	n.s.						
ÚLCERAS ORALES	n.s.						
ARTRITIS no=4 / si =36				5,6 / 22,1 P=0,003		35,5 / 18,8 P=0,003	
SEROSITIS	n.s.						
AFECT. NEUROLÓGICA no=31 / si = 9							
AFECT. RENAL no=29 / si =11		17,8 / 27,6 P=0,017	17 / 29 P=0,002		22,9 / 14,2 P=0,035		18,1 / 26,7 P=0,038
AFECT. HEMATOLÓGICA no=27 / si =13					23,8 / 13,65 P=0,009		17,78 / 26,15 P=0,034
ANTI-DNA no=7 / si =33	28,4 / 18,82 P=0,049						

ES 2 368 293 A1

TABLA 6

Regresión logística para delimitar las variables ACSL independientes que explican mejor la probabilidad de tener la manifestación lúpica indicada. Se ajusta un modelo para cada serie (N, A y SI). Se indica el coeficiente beta, la significación P y el OR con el 95% intervalo de confianza

Manifestaciones	ACSL	Beta	P-value	OR (95% CI)
1)ERITEMA FACIAL (10/30)	3A 5A	0.174 -0.074	0.032 0.006	1.19 (1.015-1.396) 0.93 (0.881-0.98)
2)CUTÁNEO (26/14)	N.S.			
3)FOTOSENSIBILIDAD (10/30)	1N	-0.034	0.029	0.97 (0.94-0.98)
4) ARTRITIS (4/36)	4SI	-0.636	0.011	0.530 (0.32-0.86)
5)ÚLCERAS BUCALES (17/23)	5N	-0.076	0.009	0.93 (0.88-0.98)
6)SEROSITIS (31/9)	N.S.			
7)AFECT. NEUROLOGICAS (31/9)	4A	-0.732	0.045	0.48 (0.23-0.98)
8)AFECT. RENAL (9/11)	3SI	1.392	0.011	4.023 (1.38-11.74)
9)AFECT. HEMATOLÓGICA (27/13)	4SI	0.542	0.02	1.72 (1.09-2.71)
10) ANA. (0/40)	N.S.			
11) ANTI-DNA. (7/33)	1A	-0.024	0.052	8 (0.95-1.00)

a) **Source:** Tan EM, *et al.*, 1982. *Arthritis Rheum* 25:1271, 1982.

N.S., no significativo.

ES 2 368 293 A1

TABLA 7

Análisis de correlación de Spearman

PARÁMETRO	ACSL	r	P
SLICC	2N	-0,314	0,048
SLEDAI	2A	-0,375	0,017
HOMOCISTEÍNA	2N	-0,415	0,009
HEMATÍES	2A	0,349	0,027
PCR	2A	-0,400	0,011
VSG	4A	-0,417	0,007
IL-2	2N	-0,415	0,009
	5SI	-0,376	0,018
IL-6	3A	0,326	0,04
	5N	0,312	0,05
IL-8	4N	0,359	0,031
	4SI	-0,349	0,037

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de los genes de la familia de las Acil-Coenzima A sintetasas de cadena larga (*ACSLs*) o de sus productos de expresión, como marcadores para el diagnóstico, pronóstico, o seguimiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes.
- 10 2. Uso de los genes de la familia de las Acil-Coenzima A sintetasas de cadena larga (*ACSLs*) o de sus productos de expresión según la reivindicación anterior, donde la enfermedad inflamatoria o autoinmune se selecciona de la lista que comprende: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, arteriosclerosis, hipertensión, diabetes no insulina dependiente tipo 2, síndrome metabólico, enfermedad de Crohn, o cualquiera de sus combinaciones.
- 15 3. Uso de los genes de la familia de las Acil-Coenzima A sintetasas de cadena larga (*ACSLs*) o de sus productos de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la enfermedad inflamatoria o autoinmune es el lupus eritematoso sistémico (LES).
- 20 4. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes, que comprende:
- a. obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y
 - b. detectar la cantidad del producto de expresión de, al menos, uno de los genes de la familia de las Acil-Coenzima A sintetasas de cadena larga (*ACSLs*) en la muestra aislada de (a).
- 25 5. Método según la reivindicación anterior, que además comprende:
- c. comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia.
- 30 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, donde la muestra biológica aislada de un individuo del paso (a) comprende células mononucleares de sangre periférica (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs).
- 35 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, donde los genes de la familia de las *ACSLs* se seleccionan de la lista que comprende: *ACSL1*, *ACSL2* (*ACSL6*), *ACSL3*, *ACSL4*, *ACSL5*, o cualquiera de sus combinaciones.
- 40 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, donde la enfermedad inflamatoria o autoinmune se selecciona de la lista que comprende: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, arteriosclerosis, hipertensión, diabetes no insulina dependiente tipo 2, síndrome metabólico, enfermedad de Crohn, o cualquiera de sus combinaciones.
- 45 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-8, donde la enfermedad inflamatoria o autoinmune es el lupus eritematoso sistémico.
- 50 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-9, que además comprende asignar al individuo del paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico cuando presenta una cantidad de producto de expresión de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: *ACSL1*, *ACSL3*, *ACSL5SI*, o cualquiera de sus combinaciones, detectados en el paso (b) menor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia.
- 55 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-10, y que además comprende asignar al individuo del paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico cuando presenta una cantidad de producto de expresión de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: *ACSL1A*, *ACSL1SI*, *ACSL2A*, *ACSL2SI*, *ACSL3SI*, *ACSL4SI*, *ACSL5*, o cualquiera de sus combinaciones, detectados en el paso (b) mayor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia.
- 60 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-11 que además comprende asignar al individuo del paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico con manifestaciones renales cuando presenta una cantidad de producto de expresión del gen *ACSL3SI* detectado en el paso (b) mayor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia.
- 65 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-12 que además comprende asignar al individuo según del paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico con manifestaciones hematológicas cuando presenta una cantidad de producto de expresión del gen *ACSL4SI* detectado en el paso (b) mayor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-13 que además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico con manifestaciones neurológicas cuando

ES 2 368 293 A1

presenta una cantidad de producto de expresión del gen *ACSL4A* detectado en el paso (b) menor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia.

5 15. Kit de diagnóstico que comprenden una pareja de cebadores que se selecciona de la lista que comprende: SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 12, par SEQ ID NO: 13/SEQ ID NO: 14; par SEQ ID NO: 15/SEQ ID NO: 16; par SEQ ID NO: 17/SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19/SEQ ID NO: 20, o cualquiera de sus combinaciones.

10 16. Uso del kit de diagnóstico según la reivindicación anterior, para el diagnóstico, pronóstico, o seguimiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 368 293 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
Servicio Andaluz de Salud

5

<120> Acil Coenzima-A sintetasa de cadena larga (ACSLs) como biomarcadores cito-serológicos en enfermedades inflamatorias o autoinmunes.

10 <130> ES1641.515

<160> 20

15 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 698

20 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

25 <221> ACSL 1

<222> (1)..(698)

<400> 1

30

Met Gln Ala His Glu Leu Phe Arg Tyr Phe Arg Met Pro Glu Leu Val
1 5 10 15

35

Asp Phe Arg Gln Tyr Val Arg Thr Leu Pro Thr Asn Thr Leu Met Gly
20 25 30

40

Phe Gly Ala Phe Ala Ala Leu Thr Thr Phe Trp Tyr Ala Thr Arg Pro
35 40 45

45

Lys Pro Leu Lys Pro Pro Cys Asp Leu Ser Met Gln Ser Val Glu Val
50 55 60

50

Ala Gly Ser Gly Gly Ala Arg Arg Ser Ala Leu Leu Asp Ser Asp Glu
65 70 75 80

55

Pro Leu Val Tyr Phe Tyr Asp Asp Val Thr Thr Leu Tyr Glu Gly Phe
85 90 95

60

Gln Arg Gly Ile Gln Val Ser Asn Asn Gly Pro Cys Leu Gly Ser Arg
100 105 110

65

Lys Pro Asp Gln Pro Tyr Glu Trp Leu Ser Tyr Lys Gln Val Ala Glu
115 120 125

Leu Ser Glu Cys Ile Gly Ser Ala Leu Ile Gln Lys Gly Phe Lys Thr
130 135 140

Ala Pro Asp Gln Phe Ile Gly Ile Phe Ala Gln Asn Arg Pro Glu Trp
145 150 155 160

65

Val Ile Ile Glu Gln Gly Cys Phe Ala Tyr Ser Met Val Ile Val Pro

ES 2 368 293 A1

			165					170						175		
5	Leu	Tyr	Asp	Thr 180	Leu	Gly	Asn	Glu	Ala 185	Ile	Thr	Tyr	Ile	Val 190	Asn	Lys
10	Ala	Glu	Leu 195	Ser	Leu	Val	Phe	Val 200	Asp	Lys	Pro	Glu	Lys 205	Ala	Lys	Leu
15	Leu	Leu 210	Glu	Gly	Val	Glu	Asn 215	Lys	Leu	Ile	Pro	Gly 220	Leu	Lys	Ile	Ile
20	Val 225	Val	Met	Asp	Ala	Tyr 230	Gly	Ser	Glu	Leu	Val 235	Glu	Arg	Gly	Gln	Arg 240
25	Cys	Gly	Val	Glu	Val 245	Thr	Ser	Met	Lys	Ala 250	Met	Glu	Asp	Leu	Gly 255	Arg
30	Ala	Asn	Arg	Arg 260	Lys	Pro	Lys	Pro	Pro 265	Ala	Pro	Glu	Asp	Leu 270	Ala	Val
35	Ile	Cys	Phe 275	Thr	Ser	Gly	Thr	Thr 280	Gly	Asn	Pro	Lys	Gly 285	Ala	Met	Val
40	Thr	His 290	Arg	Asn	Ile	Val	Ser 295	Asp	Cys	Ser	Ala	Phe 300	Val	Lys	Ala	Thr
45	Glu 305	Asn	Thr	Val	Asn	Pro 310	Cys	Pro	Asp	Asp	Thr 315	Leu	Ile	Ser	Phe	Leu 320
50	Pro	Leu	Ala	His	Met 325	Phe	Glu	Arg	Val	Val 330	Glu	Cys	Val	Met	Leu 335	Cys
55	His	Gly	Ala	Lys 340	Ile	Gly	Phe	Phe	Gln 345	Gly	Asp	Ile	Arg	Leu 350	Leu	Met
60	Asp	Asp	Leu 355	Lys	Val	Leu	Gln	Pro 360	Thr	Val	Phe	Pro	Val 365	Val	Pro	Arg
65	Leu	Leu 370	Asn	Arg	Met	Phe	Asp 375	Arg	Ile	Phe	Gly	Gln 380	Ala	Asn	Thr	Thr
70	Leu	Lys	Arg	Trp	Leu	Leu 390	Asp	Phe	Ala	Ser	Lys 395	Arg	Lys	Glu	Ala	Glu 400
75	Leu	Arg	Ser	Gly	Ile 405	Ile	Arg	Asn	Asn	Ser 410	Leu	Trp	Asp	Arg	Leu 415	Ile
80	Phe	His	Lys	Val 420	Gln	Ser	Ser	Leu	Gly 425	Gly	Arg	Val	Arg	Leu 430	Met	Val
85	Thr	Gly	Ala 435	Ala	Pro	Val	Ser	Ala 440	Thr	Val	Leu	Thr	Phe 445	Leu	Arg	Ala

ES 2 368 293 A1

Ala Leu Gly Cys Gln Phe Tyr Glu Gly Tyr Gly Gln Thr Glu Cys Thr
450 455 460

5 Ala Gly Cys Cys Leu Thr Met Pro Gly Asp Trp Thr Ala Gly His Val
465 470 475 480

10 Gly Ala Pro Met Pro Cys Asn Leu Ile Lys Leu Val Asp Val Glu Glu
485 490 495

15 Met Asn Tyr Met Ala Ala Glu Gly Glu Gly Glu Val Cys Val Lys Gly
500 505 510

20 Pro Asn Val Phe Gln Gly Tyr Leu Lys Asp Pro Ala Lys Thr Ala Glu
515 520 525

25 Ala Leu Asp Lys Asp Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Lys Trp
530 535 540

30 Leu Pro Asn Gly Thr Leu Lys Ile Ile Asp Arg Lys Lys His Ile Phe
545 550 555 560

35 Lys Leu Ala Gln Gly Glu Tyr Ile Ala Pro Glu Lys Ile Glu Asn Ile
565 570 575

40 Tyr Met Arg Ser Glu Pro Val Ala Gln Val Phe Val His Gly Glu Ser
580 585 590

45 Leu Gln Ala Phe Leu Ile Ala Ile Val Val Pro Asp Val Glu Thr Leu
595 600 605

50 Cys Ser Trp Ala Gln Lys Arg Gly Phe Glu Gly Ser Phe Glu Glu Leu
610 615 620

55 Cys Arg Asn Lys Asp Val Lys Lys Ala Ile Leu Glu Asp Met Val Arg
625 630 635 640

60 Leu Gly Lys Asp Ser Gly Leu Lys Pro Phe Glu Gln Val Lys Gly Ile
645 650 655

65 Thr Leu His Pro Glu Leu Phe Ser Ile Asp Asn Gly Leu Leu Thr Pro
660 665 670

70 Thr Met Lys Ala Lys Arg Pro Glu Leu Arg Asn Tyr Phe Arg Ser Gln
675 680 685

75 Ile Asp Asp Leu Tyr Ser Thr Ile Lys Val
690 695

65 <210> 2
<211> 722
<212> PRT

ES 2 368 293 A1

<213> *Homo sapiens*

<220>

5 <221> ACSL 2(6) isoforma a

<222> (1)..(722)

<400> 2

10 Met Leu Thr Phe Phe Leu Val Ser Gly Gly Ser Leu Trp Leu Phe Val
1 5 10 15

15 Glu Phe Val Leu Ser Leu Leu Glu Lys Met Gln Thr Gln Glu Ile Leu
20 25 30

20 Arg Ile Leu Arg Leu Pro Glu Leu Gly Asp Leu Gly Gln Phe Phe Arg
35 40 45

25 Ser Leu Ser Ala Thr Thr Leu Val Ser Met Gly Ala Leu Ala Ala Ile
50 55 60

25 Leu Ala Tyr Trp Phe Thr His Arg Pro Lys Ala Leu Gln Pro Pro Cys
65 70 75 80

30 Asn Leu Leu Met Gln Ser Glu Glu Val Glu Asp Ser Gly Gly Ala Arg
85 90 95

35 Arg Ser Val Ile Gly Ser Gly Pro Gln Leu Leu Thr His Tyr Tyr Asp
100 105 110

40 Asp Ala Arg Thr Met Tyr Gln Val Phe Arg Arg Gly Leu Ser Ile Ser
115 120 125

40 Gly Asn Gly Pro Cys Leu Gly Phe Arg Lys Pro Lys Gln Pro Tyr Gln
130 135 140

45 Trp Leu Ser Tyr Gln Glu Val Ala Asp Arg Ala Glu Phe Leu Gly Ser
145 150 155 160

50 Gly Leu Leu Gln His Asn Cys Lys Ala Cys Thr Asp Gln Phe Ile Gly
165 170 175

55 Val Phe Ala Gln Asn Arg Pro Glu Trp Ile Ile Val Glu Leu Ala Cys
180 185 190

60 Tyr Thr Tyr Ser Met Val Val Val Pro Leu Tyr Asp Thr Leu Gly Pro
195 200 205

60 Gly Ala Ile Arg Tyr Ile Ile Asn Thr Ala Asp Ile Ser Thr Val Ile
210 215 220

65 Val Asp Lys Pro Gln Lys Ala Val Leu Leu Leu Glu His Val Glu Arg
225 230 235 240

ES 2 368 293 A1

Lys Glu Thr Pro Gly₂₄₅ Leu Lys Leu Ile Ile₂₅₀ Leu Met Asp Pro Phe₂₅₅ Glu
 5 Glu Ala Leu Lys₂₆₀ Glu Arg Gly Gln Lys₂₆₅ Cys Gly Val Val Ile₂₇₀ Lys Ser
 10 Met Gln Ala₂₇₅ Val Glu Asp Cys Gly₂₈₀ Gln Glu Asn His Gln₂₈₅ Ala Pro Val
 15 Pro Pro₂₉₀ Gln Pro Asp Asp Leu₂₉₅ Ser Ile Val Cys Phe₃₀₀ Thr Ser Gly Thr
 20 Thr Gly Asn Pro Lys Gly₃₁₀ Ala Met Leu Thr His₃₁₅ Gly Asn Val Val Ala₃₂₀
 25 Asp Phe Ser Gly Phe₃₂₅ Leu Lys Val Thr Glu₃₃₀ Ser Gln Trp Ala Pro₃₃₅ Thr
 30 Cys Ala Asp Val₃₄₀ His Ile Ser Tyr Leu₃₄₅ Pro Leu Ala His Met₃₅₀ Phe Glu
 35 Arg Met Val₃₅₅ Gln Ser Val Val Tyr₃₆₀ Cys His Gly Gly Arg₃₆₅ Val Gly Phe
 40 Phe Gln₃₇₀ Gly Asp Ile Arg Leu₃₇₅ Leu Ser Asp Asp Met₃₈₀ Lys Ala Leu Cys
 45 Pro Thr Ile Phe Pro Val₃₉₀ Val Pro Arg Leu Leu₃₉₅ Asn Arg Met Tyr Asp₄₀₀
 50 Lys Ile Phe Ser Gln₄₀₅ Ala Asn Thr Pro Leu Lys Arg Trp Leu Leu₄₁₅ Glu
 55 Phe Ala Ala Lys₄₂₀ Arg Lys Gln Ala Glu₄₂₅ Val Arg Ser Gly Ile₄₃₀ Ile Arg
 60 Asn Asp Ser₄₃₅ Ile Trp Asp Glu Leu₄₄₀ Phe Phe Asn Lys Ile₄₄₅ Gln Ala Ser
 65 Leu Gly₄₅₀ Gly Cys Val Arg Met₄₅₅ Ile Val Thr Gly Ala₄₆₀ Ala Pro Ala Ser
 70 Pro Thr Val Leu Gly Phe₄₇₀ Leu Arg Ala Ala Leu₄₇₅ Gly Cys Gln Val Tyr₄₈₀
 75 Glu Gly Tyr Gly Gln₄₈₅ Thr Glu Cys Thr Ala₄₉₀ Gly Cys Thr Phe Thr Thr
 80 Pro Gly Asp Trp₅₀₀ Thr Ser Gly His Val₅₀₅ Gly Ala Pro Leu Pro₅₁₀ Cys Asn
 85 His Ile Lys Leu Val Asp Val Glu Glu Leu Asn Tyr Trp Ala Cys Lys

ES 2 368 293 A1

	515	520	525
5	Gly Glu 530	Gly Glu Ile Cys Val 535	Arg Gly Pro Asn Val 540
10	Leu Lys Asp Pro Asp 545	Arg Thr Lys Glu Ala 550	Leu Asp Ser Asp Gly Trp 555
15	Leu His Thr Gly Asp 565	Ile Gly Lys Trp Leu 570	Pro Ala Gly Thr Leu Lys 575
20	Ile Ile Asp Arg 580	Lys Lys His Ile Phe 585	Lys Leu Ala Gln Gly Glu Tyr 590
25	Val Ala Pro Glu Lys Ile 595	Glu Asn Ile Tyr Ile Arg 600	Ser Gln Pro Val 605
30	Ala Gln Ile Tyr Val His 610	Gly Asp Ser Leu Lys Ala 615	Phe Leu Val Gly 620
35	Ile Val Val Pro Asp Pro 625	Glu Val Met Pro Ser 630	Trp Ala Gln Lys Arg 635
40	Gly Ile Glu Gly Thr Tyr 645	Ala Asp Leu Cys Thr 650	Asn Lys Asp Leu Lys 655
45	Lys Ala Ile Leu Glu Asp 660	Met Val Arg Leu Gly 665	Lys Glu Ser Gly Leu 670
50	His Ser Phe Glu Gln Val 675	Lys Ala Ile His Ile His 680	Ser Asp Met Phe 685
55	Ser Val Gln Asn Gly Leu 690	Leu Thr Pro Thr Leu 695	Lys Ala Lys Arg Pro 700
60	Glu Leu Arg Glu Tyr Phe 705	Lys Lys Gln Ile Glu 710	Glu Leu Tyr Ser Ile 715
65	Ser Met		

55 <210> 3
 <211> 722
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 60 <220>
 <221> ACSL 2(6) isoforma b
 <222> (1)..(722)
 65

ES 2 368 293 A1

<400> 3

5	Met 1	Leu	Thr	Phe	Phe 5	Leu	Val	Ser	Gly	Gly 10	Ser	Leu	Trp	Leu	Phe 15	Val
	Glu	Phe	Val	Leu 20	Ser	Leu	Leu	Glu	Lys 25	Met	Gln	Thr	Gln	Glu 30	Ile	Leu
	Arg	Ile	Leu 35	Arg	Leu	Pro	Glu	Leu 40	Gly	Asp	Leu	Gly	Gln 45	Phe	Phe	Arg
	Ser	Leu 50	Ser	Ala	Thr	Thr	Leu 55	Val	Ser	Met	Gly	Ala 60	Leu	Ala	Ala	Ile
	Leu	Ala	Tyr	Trp	Phe	Thr 70	His	Arg	Pro	Lys	Ala 75	Leu	Gln	Pro	Pro	Cys 80
	Asn	Leu	Leu	Met	Gln 85	Ser	Glu	Glu	Val	Glu 90	Asp	Ser	Gly	Gly	Ala 95	Arg
	Arg	Ser	Val	Ile 100	Gly	Ser	Gly	Pro	Gln 105	Leu	Leu	Thr	His	Tyr 110	Tyr	Asp
	Asp	Ala	Arg 115	Thr	Met	Tyr	Gln	Val 120	Phe	Arg	Arg	Gly	Leu 125	Ser	Ile	Ser
	Gly	Asn 130	Gly	Pro	Cys	Leu	Gly 135	Phe	Arg	Lys	Pro	Lys 140	Gln	Pro	Tyr	Gln
	Trp	Leu	Ser	Tyr	Gln	Glu 150	Val	Ala	Asp	Arg	Ala 155	Glu	Phe	Leu	Gly	Ser 160
	Gly	Leu	Leu	Gln	His 165	Asn	Cys	Lys	Ala	Cys 170	Thr	Asp	Gln	Phe	Ile 175	Gly
	Val	Phe	Ala	Gln 180	Asn	Arg	Pro	Glu	Trp 185	Ile	Ile	Val	Glu	Leu 190	Ala	Cys
	Tyr	Thr	Tyr 195	Ser	Met	Val	Val	Val 200	Pro	Leu	Tyr	Asp	Thr 205	Leu	Gly	Pro
	Gly	Ala	Ile	Arg	Tyr	Ile	Ile 215	Asn	Thr	Ala	Asp	Ile 220	Ser	Thr	Val	Ile
	Val	Asp	Lys	Pro	Gln	Lys 230	Ala	Val	Leu	Leu	Leu 235	Glu	His	Val	Glu	Arg 240
	Lys	Glu	Thr	Pro	Gly 245	Leu	Lys	Leu	Ile	Ile 250	Leu	Met	Asp	Pro	Phe	Glu 255
	Glu	Ala	Leu	Lys 260	Glu	Arg	Gly	Gln	Lys 265	Cys	Gly	Val	Val	Ile 270	Lys	Ser
	Met	Gln	Ala 275	Val	Glu	Asp	Cys	Gly 280	Gln	Glu	Asn	His	Gln 285	Ala	Pro	Val

ES 2 368 293 A1

	Pro	Pro	Gln	Pro	Asp	Asp	Leu	Ser	Ile	Val	Cys	Phe	Thr	Ser	Gly	Thr
		290					295					300				
5	Thr	Gly	Asn	Pro	Lys	Gly	Ala	Met	Leu	Thr	His	Gly	Asn	Val	Val	Ala
	305					310					315					320
10	Asp	Phe	Ser	Gly	Phe	Leu	Lys	Val	Thr	Glu	Lys	Val	Ile	Phe	Pro	Arg
					325					330					335	
15	Gln	Asp	Asp	Val	Leu	Ile	Ser	Phe	Leu	Pro	Leu	Ala	His	Met	Phe	Glu
				340					345					350		
20	Arg	Val	Ile	Gln	Ser	Val	Val	Tyr	Cys	His	Gly	Gly	Arg	Val	Gly	Phe
			355					360					365			
25	Phe	Gln	Gly	Asp	Ile	Arg	Leu	Leu	Ser	Asp	Asp	Met	Lys	Ala	Leu	Cys
		370					375					380				
30	Pro	Thr	Ile	Phe	Pro	Val	Val	Pro	Arg	Leu	Leu	Asn	Arg	Met	Tyr	Asp
	385					390					395					400
35	Lys	Ile	Phe	Ser	Gln	Ala	Asn	Thr	Pro	Leu	Lys	Arg	Trp	Leu	Leu	Glu
					405					410					415	
40	Phe	Ala	Ala	Lys	Arg	Lys	Gln	Ala	Glu	Val	Arg	Ser	Gly	Ile	Ile	Arg
				420					425					430		
45	Asn	Asp	Ser	Ile	Trp	Asp	Glu	Leu	Phe	Phe	Asn	Lys	Ile	Gln	Ala	Ser
			435					440					445			
50	Leu	Gly	Gly	Cys	Val	Arg	Met	Ile	Val	Thr	Gly	Ala	Ala	Pro	Ala	Ser
		450					455					460				
55	Pro	Thr	Val	Leu	Gly	Phe	Leu	Arg	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Gln	Val	Tyr
	465					470					475					480
60	Glu	Gly	Tyr	Gly	Gln	Thr	Glu	Cys	Thr	Ala	Gly	Cys	Thr	Phe	Thr	Thr
					485					490					495	
65	Pro	Gly	Asp	Trp	Thr	Ser	Gly	His	Val	Gly	Ala	Pro	Leu	Pro	Cys	Asn
				500					505					510		
70	His	Ile	Lys	Leu	Val	Asp	Val	Glu	Glu	Leu	Asn	Tyr	Trp	Ala	Cys	Lys
			515					520					525			
75	Gly	Glu	Gly	Glu	Ile	Cys	Val	Arg	Gly	Pro	Asn	Val	Phe	Lys	Gly	Tyr
		530					535					540				
80	Leu	Lys	Asp	Pro	Asp	Arg	Thr	Lys	Glu	Ala	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Trp
	545					550					555					560

ES 2 368 293 A1

Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Lys Trp Leu Pro Ala Gly Thr Leu Lys
 565 570 575
 5 Ile Ile Asp Arg Lys Lys His Ile Phe Lys Leu Ala Gln Gly Glu Tyr
 580 585 590
 Val Ala Pro Glu Lys Ile Glu Asn Ile Tyr Ile Arg Ser Gln Pro Val
 595 600 605
 10 Ala Gln Ile Tyr Val His Gly Asp Ser Leu Lys Ala Phe Leu Val Gly
 610 615 620
 15 Ile Val Val Pro Asp Pro Glu Val Met Pro Ser Trp Ala Gln Lys Arg
 625 630 635 640
 20 Gly Ile Glu Gly Thr Tyr Ala Asp Leu Cys Thr Asn Lys Asp Leu Lys
 645 650 655
 Lys Ala Ile Leu Glu Asp Met Val Arg Leu Gly Lys Glu Ser Gly Leu
 660 665 670
 25 His Ser Phe Glu Gln Val Lys Ala Ile His Ile His Ser Asp Met Phe
 675 680 685
 30 Ser Val Gln Asn Gly Leu Leu Thr Pro Thr Leu Lys Ala Lys Arg Pro
 690 695 700
 35 Glu Leu Arg Glu Tyr Phe Lys Lys Gln Ile Glu Glu Leu Tyr Ser Ile
 705 710 715 720
 Ser Met
 <210> 4
 40 <211> 720
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45 <220>
 <221> ACSL 3
 <222> (1)..(720)
 50 <400> 4
 55 Met Asn Asn His Val Ser Ser Lys Pro Ser Thr Met Lys Leu Lys His
 1 5 10 15
 Thr Ile Asn Pro Ile Leu Leu Tyr Phe Ile His Phe Leu Ile Ser Leu
 20 25 30
 60 Tyr Thr Ile Leu Thr Tyr Ile Pro Phe Tyr Phe Phe Ser Glu Ser Arg
 35 40 45
 65 Gln Glu Lys Ser Asn Arg Ile Lys Ala Lys Pro Val Asn Ser Lys Pro

ES 2 368 293 A1

	50		55		60															
5	Asp 65	Ser	Ala	Tyr	Arg	Ser 70	Val	Asn	Ser	Leu	Asp 75	Gly	Leu	Ala	Ser	Val 80				
10	Leu	Tyr	Pro	Gly	Cys 85	Asp	Thr	Leu	Asp	Lys 90	Val	Phe	Thr	Tyr	Ala 95	Lys				
15	Asn	Lys	Phe	Lys 100	Asn	Lys	Arg	Leu	Leu 105	Gly	Thr	Arg	Glu	Val 110	Leu	Asn				
20	Glu	Glu	Asp 115	Glu	Val	Gln	Pro	Asn 120	Gly	Lys	Ile	Phe	Lys 125	Lys	Val	Ile				
25	Leu	Gly 130	Gln	Tyr	Asn	Trp	Leu 135	Ser	Tyr	Glu	Asp	Val 140	Phe	Val	Arg	Ala				
30	Phe 145	Asn	Phe	Gly	Asn	Gly 150	Leu	Gln	Met	Leu	Gly 155	Gln	Lys	Pro	Lys	Thr 160				
35	Asn	Ile	Ala	Ile	Phe 165	Cys	Glu	Thr	Arg	Ala 170	Glu	Trp	Met	Ile	Ala 175	Ala				
40	Gln	Ala	Cys	Phe 180	Met	Tyr	Asn	Phe	Gln 185	Leu	Val	Thr	Leu	Tyr 190	Ala	Thr				
45	Leu	Gly	Gly 195	Pro	Ala	Ile	Val	His 200	Ala	Leu	Asn	Glu	Thr 205	Glu	Val	Thr				
50	Asn	Ile 210	Ile	Thr	Ser	Lys	Glu 215	Leu	Leu	Gln	Thr	Lys 220	Leu	Lys	Asp	Ile				
55	Val 225	Ser	Leu	Val	Pro	Arg 230	Leu	Arg	His	Ile	Ile 235	Thr	Val	Asp	Gly	Lys 240				
60	Pro	Pro	Thr	Trp	Ser 245	Glu	Phe	Pro	Lys	Gly 250	Ile	Ile	Val	His	Thr 255	Met				
65	Ala	Ala	Val	Glu 260	Ala	Leu	Gly	Ala	Lys 265	Ala	Ser	Met	Glu	Asn 270	Gln	Pro				
70	His	Ser	Lys 275	Pro	Leu	Pro	Ser	Asp 280	Ile	Ala	Val	Ile	Met 285	Tyr	Thr	Ser				
75	Gly	Ser 290	Thr	Gly	Leu	Pro	Lys 295	Gly	Val	Met	Ile	Ser 300	His	Ser	Asn	Ile				
80	Ile 305	Ala	Gly	Ile	Thr	Gly 310	Met	Ala	Glu	Arg	Ile 315	Pro	Glu	Leu	Gly	Glu 320				
85	Glu	Asp	Val	Tyr	Ile 325	Gly	Tyr	Leu	Pro	Leu 330	Ala	His	Val	Leu	Glu 335	Leu				

ES 2 368 293 A1

Ser Ala Glu Leu Val Cys Leu Ser His Gly Cys Arg Ile Gly Tyr Ser
 340 345 350

5
 Ser Pro Gln Thr Leu Ala Asp Gln Ser Ser Lys Ile Lys Lys Gly Ser
 355 360 365

10
 Lys Gly Asp Thr Ser Met Leu Lys Pro Thr Leu Met Ala Ala Val Pro
 370 375 380

15
 Glu Ile Met Asp Arg Ile Tyr Lys Asn Val Met Asn Lys Val Ser Glu
 385 390 395 400

20
 Met Ser Ser Phe Gln Arg Asn Leu Phe Ile Leu Ala Tyr Asn Tyr Lys
 405 410 415

25
 Met Glu Gln Ile Ser Lys Gly Arg Asn Thr Pro Leu Cys Asp Ser Phe
 420 425 430

30
 Val Phe Arg Lys Val Arg Ser Leu Leu Gly Gly Asn Ile Arg Leu Leu
 435 440 445

35
 Leu Cys Gly Gly Ala Pro Leu Ser Ala Thr Thr Gln Arg Phe Met Asn
 450 455 460

40
 Ile Cys Phe Cys Cys Pro Val Gly Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Ser
 465 470 475 480

45
 Ala Gly Ala Gly Thr Ile Ser Glu Val Trp Asp Tyr Asn Thr Gly Arg
 485 490 495

50
 Val Gly Ala Pro Leu Val Cys Cys Glu Ile Lys Leu Lys Asn Trp Glu
 500 505 510

55
 Glu Gly Gly Tyr Phe Asn Thr Asp Lys Pro His Pro Arg Gly Glu Ile
 515 520 525

60
 Leu Ile Gly Gly Gln Ser Val Thr Met Gly Tyr Tyr Lys Asn Glu Ala
 530 535 540

65
 Lys Thr Lys Ala Asp Phe Phe Glu Asp Glu Asn Gly Gln Arg Trp Leu
 545 550 555 560

70
 Cys Thr Gly Asp Ile Gly Glu Phe Glu Pro Asp Gly Cys Leu Lys Ile
 565 570 575

75
 Ile Asp Arg Lys Lys Asp Leu Val Lys Leu Gln Ala Gly Glu Tyr Val
 580 585 590

80
 Ser Leu Gly Lys Val Glu Ala Ala Leu Lys Asn Leu Pro Leu Val Asp
 595 600 605

ES 2 368 293 A1

Asn Ile Cys Ala Tyr Ala Asn Ser Tyr His Ser Tyr Val Ile Gly Phe
 610 615 620

5
 Val Val Pro Asn Gln Lys Glu Leu Thr Glu Leu Ala Arg Lys Lys Gly
 625 630 635 640

10
 Leu Lys Gly Thr Trp Glu Glu Leu Cys Asn Ser Cys Glu Met Glu Asn
 645 650 655

15
 Glu Val Leu Lys Val Leu Ser Glu Ala Ala Ile Ser Ala Ser Leu Glu
 660 665 670

20
 Lys Phe Glu Ile Pro Val Lys Ile Arg Leu Ser Pro Glu Pro Trp Thr
 675 680 685

25
 Pro Glu Thr Gly Leu Val Thr Asp Ala Phe Lys Leu Lys Arg Lys Glu
 690 695 700

30
 Leu Lys Thr His Tyr Gln Ala Asp Ile Glu Arg Met Tyr Gly Arg Lys
 705 710 715 720

<210> 5
 <211> 670
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35
 <220>
 <221> ACSL 4 isoforma 1
 <222> (1)..(670)

40
 <400> 5

Met Ala Lys Arg Ile Lys Ala Lys Pro Thr Ser Asp Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

45
 Pro Tyr Arg Ser Val Thr His Phe Asp Ser Leu Ala Val Ile Asp Ile
 20 25 30

50
 Pro Gly Ala Asp Thr Leu Asp Lys Leu Phe Asp His Ala Val Ser Lys
 35 40 45

55
 Phe Gly Lys Lys Asp Ser Leu Gly Thr Arg Glu Ile Leu Ser Glu Glu
 50 55 60

60
 Asn Glu Met Gln Pro Asn Gly Lys Val Phe Lys Lys Leu Ile Leu Gly
 65 70 75 80

65
 Asn Tyr Lys Trp Met Asn Tyr Leu Glu Val Asn Arg Arg Val Asn Asn
 85 90 95

Phe Gly Ser Gly Leu Thr Ala Leu Gly Leu Lys Pro Lys Asn Thr Ile
 100 105 110

ES 2 368 293 A1

	Ala	Ile	Phe 115	Cys	Glu	Thr	Arg	Ala 120	Glu	Trp	Met	Ile	Ala 125	Ala	Gln	Thr
5	Cys	Phe 130	Lys	Tyr	Asn	Phe	Pro 135	Leu	Val	Thr	Leu	Tyr 140	Ala	Thr	Leu	Gly
10	Lys 145	Glu	Ala	Val	Val	His 150	Gly	Leu	Asn	Glu	Ser 155	Glu	Ala	Ser	Tyr	Leu 160
15	Ile	Thr	Ser	Val	Glu 165	Leu	Leu	Glu	Ser	Lys 170	Leu	Lys	Thr	Ala	Leu 175	Leu
20	Asp	Ile	Ser	Cys 180	Val	Lys	His	Ile	Ile 185	Tyr	Val	Asp	Asn	Lys 190	Ala	Ile
25	Asn	Lys	Ala 195	Glu	Tyr	Pro	Glu	Gly 200	Phe	Glu	Ile	His	Ser 205	Met	Gln	Ser
30	Val	Glu 210	Glu	Leu	Gly	Ser	Asn 215	Pro	Glu	Asn	Leu	Gly 220	Ile	Pro	Pro	Ser
35	Arg 225	Pro	Thr	Pro	Ser	Asp 230	Met	Ala	Ile	Val	Met 235	Tyr	Thr	Ser	Gly	Ser 240
40	Thr	Gly	Arg	Pro	Lys 245	Gly	Val	Met	Met	His 250	His	Ser	Asn	Leu	Ile 255	Ala
45	Gly	Met	Thr	Gly 260	Gln	Cys	Glu	Arg	Ile 265	Pro	Gly	Leu	Gly	Pro 270	Lys	Asp
50	Thr	Tyr	Ile 275	Gly	Tyr	Leu	Pro	Leu 280	Ala	His	Val	Leu	Glu 285	Leu	Thr	Ala
55	Glu	Ile 290	Ser	Cys	Phe	Thr	Tyr 295	Gly	Cys	Arg	Ile	Gly 300	Tyr	Ser	Ser	Pro
60	Leu 305	Thr	Leu	Ser	Asp	Gln 310	Ser	Ser	Lys	Ile	Lys 315	Lys	Gly	Ser	Lys	Gly 320
65	Asp	Cys	Thr	Val	Leu 325	Lys	Pro	Thr	Leu	Met 330	Ala	Ala	Val	Pro	Glu 335	Ile
70	Met	Asp	Arg	Ile 340	Tyr	Lys	Asn	Val	Met 345	Ser	Lys	Val	Gln	Glu 350	Met	Asn
75	Tyr	Ile	Gln 355	Lys	Thr	Leu	Phe	Lys 360	Ile	Gly	Tyr	Asp	Tyr 365	Lys	Leu	Glu
80	Gln	Ile 370	Lys	Lys	Gly	Tyr	Asp 375	Ala	Pro	Leu	Cys	Asn 380	Leu	Leu	Leu	Phe
85	Lys	Lys	Val	Lys	Ala	Leu	Leu	Gly	Gly	Asn	Val	Arg	Met	Met	Leu	Ser

ES 2 368 293 A1

	385		390		395		400									
5	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu 405	Ser	Pro	Gln	Thr	His 410	Arg	Phe	Met	Asn	Val 415	Cys
10	Phe	Cys	Cys	Pro 420	Ile	Gly	Gln	Gly	Tyr 425	Gly	Leu	Thr	Glu	Ser 430	Cys	Gly
15	Ala	Gly	Thr 435	Val	Thr	Glu	Val	Thr 440	Asp	Tyr	Thr	Thr	Gly 445	Arg	Val	Gly
20	Ala	Pro 450	Leu	Ile	Cys	Cys	Glu 455	Ile	Lys	Leu	Lys	Asp 460	Trp	Gln	Glu	Gly
25	Gly	Tyr	Thr	Ile	Asn	Asp 470	Lys	Pro	Asn	Pro	Arg 475	Gly	Glu	Ile	Val	Ile 480
30	Gly	Gly	Gln	Asn	Ile 485	Ser	Met	Gly	Tyr	Phe 490	Lys	Asn	Glu	Glu	Lys 495	Thr
35	Ala	Glu	Asp	Tyr 500	Ser	Val	Asp	Glu	Asn 505	Gly	Gln	Arg	Trp	Phe 510	Cys	Thr
40	Gly	Asp	Ile 515	Gly	Glu	Phe	His	Pro 520	Asp	Gly	Cys	Leu	Gln 525	Ile	Ile	Asp
45	Arg	Lys 530	Lys	Asp	Leu	Val	Lys 535	Leu	Gln	Ala	Gly	Glu 540	Tyr	Val	Ser	Leu
50	Gly	Lys	Val	Glu	Ala	Ala 550	Leu	Lys	Asn	Cys	Pro 555	Leu	Ile	Asp	Asn	Ile 560
55	Cys	Ala	Phe	Ala	Lys 565	Ser	Asp	Gln	Ser	Tyr 570	Val	Ile	Ser	Phe	Val 575	Val
60	Pro	Asn	Gln	Lys 580	Arg	Leu	Thr	Leu	Leu 585	Ala	Gln	Gln	Lys	Gly 590	Val	Glu
65	Gly	Thr	Trp 595	Val	Asp	Ile	Cys	Asn 600	Asn	Pro	Ala	Met	Glu 605	Ala	Glu	Ile
70	Leu	Lys 610	Glu	Ile	Arg	Glu	Ala 615	Ala	Asn	Ala	Met	Lys 620	Leu	Glu	Arg	Phe
75	Glu	Ile	Pro	Ile	Lys	Val 630	Arg	Leu	Ser	Pro	Glu 635	Pro	Trp	Thr	Pro	Glu 640
80	Thr	Gly	Leu	Val	Thr 645	Asp	Ala	Phe	Lys	Leu 650	Lys	Arg	Lys	Glu	Leu 655	Arg
85	Asn	His	Tyr	Leu 660	Lys	Asp	Ile	Glu	Arg 665	Met	Tyr	Gly	Gly	Lys 670		

ES 2 368 293 A1

<210> 6
 <211> 711
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> ACSL 4 isoforma 2
 10 <222> (1)..(711)

 <400> 6

 15 Met Lys Leu Lys Leu Asn Val Leu Thr Ile Ile Leu Leu Pro Val His
 1 5 10 15

 20 Leu Leu Ile Thr Ile Tyr Ser Ala Leu Ile Phe Ile Pro Trp Tyr Phe
 20 25 30

 25 Leu Thr Asn Ala Lys Lys Lys Asn Ala Met Ala Lys Arg Ile Lys Ala
 35 40 45

 30 Lys Pro Thr Ser Asp Lys Pro Gly Ser Pro Tyr Arg Ser Val Thr His
 50 55 60

 35 Phe Asp Ser Leu Ala Val Ile Asp Ile Pro Gly Ala Asp Thr Leu Asp
 65 70 75 80

 40 Lys Leu Phe Asp His Ala Val Ser Lys Phe Gly Lys Lys Asp Ser Leu
 85 90 95

 45 Gly Thr Arg Glu Ile Leu Ser Glu Glu Asn Glu Met Gln Pro Asn Gly
 100 105 110

 50 Lys Val Phe Lys Lys Leu Ile Leu Gly Asn Tyr Lys Trp Met Asn Tyr
 115 120 125

 55 Leu Glu Val Asn Arg Arg Val Asn Asn Phe Gly Ser Gly Leu Thr Ala
 130 135 140

 60 Leu Gly Leu Lys Pro Lys Asn Thr Ile Ala Ile Phe Cys Glu Thr Arg
 145 150 155 160

 65 Ala Glu Trp Met Ile Ala Ala Gln Thr Cys Phe Lys Tyr Asn Phe Pro
 165 170 175

 70 Leu Val Thr Leu Tyr Ala Thr Leu Gly Lys Glu Ala Val Val His Gly
 180 185 190

 75 Leu Asn Glu Ser Glu Ala Ser Tyr Leu Ile Thr Ser Val Glu Leu Leu
 195 200 205

 80 Glu Ser Lys Leu Lys Thr Ala Leu Leu Asp Ile Ser Cys Val Lys His
 210 215 220

ES 2 368 293 A1

	Ile 225	Ile	Tyr	Val	Asp	Asn 230	Lys	Ala	Ile	Asn	Lys 235	Ala	Glu	Tyr	Pro	Glu 240
5	Gly	Phe	Glu	Ile	His 245	Ser	Met	Gln	Ser	Val 250	Glu	Glu	Leu	Gly	Ser 255	Asn
10	Pro	Glu	Asn	Leu 260	Gly	Ile	Pro	Pro	Ser 265	Arg	Pro	Thr	Pro	Ser 270	Asp	Met
15	Ala	Ile	Val 275	Met	Tyr	Thr	Ser	Gly 280	Ser	Thr	Gly	Arg	Pro 285	Lys	Gly	Val
20	Met	Met 290	His	His	Ser	Asn	Leu 295	Ile	Ala	Gly	Met	Thr 300	Gly	Gln	Cys	Glu
25	Arg 305	Ile	Pro	Gly	Leu	Gly 310	Pro	Lys	Asp	Thr	Tyr 315	Ile	Gly	Tyr	Leu	Pro 320
30	Leu	Ala	His	Val 325	Leu	Glu	Leu	Thr	Ala	Glu 330	Ile	Ser	Cys	Phe	Thr 335	Tyr
35	Gly	Cys	Arg	Ile 340	Gly	Tyr	Ser	Ser	Pro 345	Leu	Thr	Leu	Ser	Asp 350	Gln	Ser
40	Ser	Lys	Ile 355	Lys	Lys	Gly	Ser	Lys 360	Gly	Asp	Cys	Thr	Val 365	Leu	Lys	Pro
45	Thr	Leu 370	Met	Ala	Ala	Val	Pro 375	Glu	Ile	Met	Asp	Arg 380	Ile	Tyr	Lys	Asn
50	Val 385	Met	Ser	Lys	Val	Gln 390	Glu	Met	Asn	Tyr	Ile 395	Gln	Lys	Thr	Leu	Phe 400
55	Lys	Ile	Gly	Tyr	Asp 405	Tyr	Lys	Leu	Glu	Gln 410	Ile	Lys	Lys	Gly	Tyr 415	Asp
60	Ala	Pro	Leu	Cys 420	Asn	Leu	Leu	Leu	Phe 425	Lys	Lys	Val	Lys	Ala 430	Leu	Leu
65	Gly	Gly	Asn 435	Val	Arg	Met	Met	Leu 440	Ser	Gly	Gly	Ala	Pro 445	Leu	Ser	Pro
70	Gln	Thr 450	His	Arg	Phe	Met	Asn 455	Val	Cys	Phe	Cys	Cys 460	Pro	Ile	Gly	Gln
75	Gly 465	Tyr	Gly	Leu	Thr	Glu 470	Ser	Cys	Gly	Ala	Gly 475	Thr	Val	Thr	Glu	Val 480
80	Thr	Asp	Tyr	Thr	Thr 485	Gly	Arg	Val	Gly	Ala 490	Pro	Leu	Ile	Cys	Cys 495	Glu

ES 2 368 293 A1

Ile Lys Leu Lys Asp Trp Gln Glu Gly Gly Tyr Thr Ile Asn Asp Lys
 500 505 510

5
 Pro Asn Pro Arg Gly Glu Ile Val Ile Gly Gly Gln Asn Ile Ser Met
 515 520 525

10
 Gly Tyr Phe Lys Asn Glu Glu Lys Thr Ala Glu Asp Tyr Ser Val Asp
 530 535 540

15
 Glu Asn Gly Gln Arg Trp Phe Cys Thr Gly Asp Ile Gly Glu Phe His
 545 550 555 560

20
 Pro Asp Gly Cys Leu Gln Ile Ile Asp Arg Lys Lys Asp Leu Val Lys
 565 570 575

25
 Leu Gln Ala Gly Glu Tyr Val Ser Leu Gly Lys Val Glu Ala Ala Leu
 580 585 590

30
 Lys Asn Cys Pro Leu Ile Asp Asn Ile Cys Ala Phe Ala Lys Ser Asp
 595 600 605

35
 Gln Ser Tyr Val Ile Ser Phe Val Val Pro Asn Gln Lys Arg Leu Thr
 610 615 620

40
 Leu Leu Ala Gln Gln Lys Gly Val Glu Gly Thr Trp Val Asp Ile Cys
 625 630 635 640

45
 Asn Asn Pro Ala Met Glu Ala Glu Ile Leu Lys Glu Ile Arg Glu Ala
 645 650 655

50
 Ala Asn Ala Met Lys Leu Glu Arg Phe Glu Ile Pro Ile Lys Val Arg
 660 665 670

55
 Leu Ser Pro Glu Pro Trp Thr Pro Glu Thr Gly Leu Val Thr Asp Ala
 675 680 685

60
 Phe Lys Leu Lys Arg Lys Glu Leu Arg Asn His Tyr Leu Lys Asp Ile
 690 695 700

65
 Glu Arg Met Tyr Gly Gly Lys
 705 710

<210> 7

<211> 683

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> ACSL 5 isoforma b

<222> (1)..(683)

ES 2 368 293 A1

<400> 7

5	Met 1	Leu	Phe	Ile	Phe 5	Asn	Phe	Leu	Phe	Ser 10	Pro	Leu	Pro	Thr	Pro 15	Ala
	Leu	Ile	Cys	Ile 20	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala 25	Ala	Ile	Phe	Leu	Trp 30	Leu	Ile
10	Thr	Arg	Pro 35	Gln	Pro	Val	Leu	Pro 40	Leu	Leu	Asp	Leu	Asn 45	Asn	Gln	Ser
	Val	Gly 50	Ile	Glu	Gly	Gly	Ala 55	Arg	Lys	Gly	Val	Ser 60	Gln	Lys	Asn	Asn
15	Asp 65	Leu	Thr	Ser	Cys	Cys 70	Phe	Ser	Asp	Ala	Lys 75	Thr	Met	Tyr	Glu	Val 80
20	Phe	Gln	Arg	Gly	Leu 85	Ala	Val	Ser	Asp	Asn 90	Gly	Pro	Cys	Leu	Gly 95	Tyr
25	Arg	Lys	Pro	Asn 100	Gln	Pro	Tyr	Arg	Trp 105	Leu	Ser	Tyr	Lys	Gln 110	Val	Ser
30	Asp	Arg	Ala 115	Glu	Tyr	Leu	Gly	Ser 120	Cys	Leu	Leu	His	Lys 125	Gly	Tyr	Lys
35	Ser	Ser 130	Pro	Asp	Gln	Phe	Val 135	Gly	Ile	Phe	Ala	Gln 140	Asn	Arg	Pro	Glu
40	Trp 145	Ile	Ile	Ser	Glu	Leu 150	Ala	Cys	Tyr	Thr	Tyr 155	Ser	Met	Val	Ala	Val 160
45	Pro	Leu	Tyr	Asp	Thr 165	Leu	Gly	Pro	Glu	Ala 170	Ile	Val	His	Ile	Val 175	Asn
50	Lys	Ala	Asp	Ile 180	Ala	Met	Val	Ile	Cys 185	Asp	Thr	Pro	Gln	Lys 190	Ala	Leu
55	Val	Leu	Ile 195	Gly	Asn	Val	Glu	Lys 200	Gly	Phe	Thr	Pro	Ser 205	Leu	Lys	Val
60	Ile	Ile 210	Leu	Met	Asp	Pro	Phe 215	Asp	Asp	Asp	Leu	Lys 220	Gln	Arg	Gly	Glu
65	Lys 225	Ser	Gly	Ile	Glu	Ile 230	Leu	Ser	Leu	Tyr	Asp 235	Ala	Glu	Asn	Leu	Gly 240
70	Lys	Glu	His	Phe	Arg 245	Lys	Pro	Val	Pro	Pro 250	Ser	Pro	Glu	Asp	Leu 255	Ser
75	Val	Ile	Cys	Phe 260	Thr	Ser	Gly	Thr	Thr 265	Gly	Asp	Pro	Lys	Gly 270	Ala	Met
80	Ile	Thr	His 275	Gln	Asn	Ile	Val	Ser 280	Asn	Ala	Ala	Ala	Phe 285	Leu	Lys	Cys

ES 2 368 293 A1

	Val	Glu 290	His	Ala	Tyr	Glu	Pro 295	Thr	Pro	Asp	Asp	Val 300	Ala	Ile	Ser	Tyr
5	Leu 305	Pro	Leu	Ala	His	Met 310	Phe	Glu	Arg	Ile	Val 315	Gln	Ala	Val	Val	Tyr 320
10	Ser	Cys	Gly	Ala	Arg 325	Val	Gly	Phe	Phe	Gln 330	Gly	Asp	Ile	Arg	Leu 335	Leu
15	Ala	Asp	Asp	Met 340	Lys	Thr	Leu	Lys	Pro 345	Thr	Leu	Phe	Pro	Ala 350	Val	Pro
20	Arg	Leu	Leu 355	Asn	Arg	Ile	Tyr	Asp 360	Lys	Val	Gln	Asn	Glu 365	Ala	Lys	Thr
25	Pro	Leu 370	Lys	Lys	Phe	Leu	Leu 375	Lys	Leu	Ala	Val	Ser 380	Ser	Lys	Phe	Lys
30	Glu 385	Leu	Gln	Lys	Gly	Ile 390	Ile	Arg	His	Asp	Ser 395	Phe	Trp	Asp	Lys	Leu 400
35	Ile	Phe	Ala	Lys	Ile 405	Gln	Asp	Ser	Leu	Gly 410	Gly	Arg	Val	Arg	Val 415	Ile
40	Val	Thr	Gly	Ala 420	Ala	Pro	Met	Ser	Thr 425	Ser	Val	Met	Thr	Phe 430	Phe	Arg
45	Ala	Ala	Met 435	Gly	Cys	Gln	Val	Tyr 440	Glu	Ala	Tyr	Gly	Gln 445	Thr	Glu	Cys
50	Thr	Gly 450	Gly	Cys	Thr	Phe	Thr 455	Leu	Pro	Gly	Asp	Trp 460	Thr	Ser	Gly	His
55	Val 465	Gly	Val	Pro	Leu	Ala 470	Cys	Asn	Tyr	Val	Lys 475	Leu	Glu	Asp	Val	Ala 480
60	Asp	Met	Asn	Tyr	Phe 485	Thr	Val	Asn	Asn	Glu 490	Gly	Glu	Val	Cys	Ile 495	Lys
65	Gly	Thr	Asn	Val 500	Phe	Lys	Gly	Tyr	Leu 505	Lys	Asp	Pro	Glu	Lys 510	Thr	Gln
70	Glu	Ala	Leu 515	Asp	Ser	Asp	Gly	Trp 520	Leu	His	Thr	Gly	Asp 525	Ile	Gly	Arg
75	Trp	Leu 530	Pro	Asn	Gly	Thr	Leu 535	Lys	Ile	Ile	Asp	Arg 540	Lys	Lys	Asn	Ile
80	Phe 545	Lys	Leu	Ala	Gln	Gly 550	Glu	Tyr	Ile	Ala	Pro 555	Glu	Lys	Ile	Glu	Asn 560

ES 2 368 293 A1

Ile Tyr Asn Arg Ser Gln Pro Val Leu Gln Ile Phe Val His Gly Glu
565 570 575

5 Ser Leu Arg Ser Ser Leu Val Gly Val Val Val Pro Asp Thr Asp Val
580 585 590

10 Leu Pro Ser Phe Ala Ala Lys Leu Gly Val Lys Gly Ser Phe Glu Glu
595 600 605

15 Leu Cys Gln Asn Gln Val Val Arg Glu Ala Ile Leu Glu Asp Leu Gln
610 615 620

20 Lys Ile Gly Lys Glu Ser Gly Leu Lys Thr Phe Glu Gln Val Lys Ala
625 630 635 640

Ile Phe Leu His Pro Glu Pro Phe Ser Ile Glu Asn Gly Leu Leu Thr
645 650 655

25 Pro Thr Leu Lys Ala Lys Arg Gly Glu Leu Ser Lys Tyr Phe Arg Thr
660 665 670

Gln Ile Asp Ser Leu Tyr Glu His Ile Gln Asp
675 680

30 <210> 8
<211> 739
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <220>
<221> ACSL 5 isoforma a
40 <222> (1)..(739)

<400> 8

45 Met Asp Ala Leu Lys Pro Pro Cys Leu Trp Arg Asn His Glu Arg Gly
1 5 10 15

50 Lys Lys Asp Arg Asp Ser Cys Gly Arg Lys Asn Ser Glu Pro Gly Ser
20 25 30

55 Pro His Ser Leu Glu Ala Leu Arg Asp Ala Ala Pro Ser Gln Gly Leu
35 40 45

Asn Phe Leu Leu Leu Phe Thr Lys Met Leu Phe Ile Phe Asn Phe Leu
50 55 60

60 Phe Ser Pro Leu Pro Thr Pro Ala Leu Ile Cys Ile Leu Thr Phe Gly
65 70 75 80

65 Ala Ala Ile Phe Leu Trp Leu Ile Thr Arg Pro Gln Pro Val Leu Pro
85 90 95

ES 2 368 293 A1

Leu Leu Asp Leu Asn Asn Gln Ser Val Gly Ile Glu Gly Gly Ala Arg
 100 105 110

5
 Lys Gly Val Ser Gln Lys Asn Asn Asp Leu Thr Ser Cys Cys Phe Ser
 115 120 125

10
 Asp Ala Lys Thr Met Tyr Glu Val Phe Gln Arg Gly Leu Ala Val Ser
 130 135 140

15
 Asp Asn Gly Pro Cys Leu Gly Tyr Arg Lys Pro Asn Gln Pro Tyr Arg
 145 150 155 160

20
 Trp Leu Ser Tyr Lys Gln Val Ser Asp Arg Ala Glu Tyr Leu Gly Ser
 165 170 175

25
 Cys Leu Leu His Lys Gly Tyr Lys Ser Ser Pro Asp Gln Phe Val Gly
 180 185 190

30
 Ile Phe Ala Gln Asn Arg Pro Glu Trp Ile Ile Ser Glu Leu Ala Cys
 195 200 205

35
 Tyr Thr Tyr Ser Met Val Ala Val Pro Leu Tyr Asp Thr Leu Gly Pro
 210 215 220

40
 Glu Ala Ile Val His Ile Val Asn Lys Ala Asp Ile Ala Met Val Ile
 225 230 235 240

45
 Cys Asp Thr Pro Gln Lys Ala Leu Val Leu Ile Gly Asn Val Glu Lys
 245 250 255

50
 Gly Phe Thr Pro Ser Leu Lys Val Ile Ile Leu Met Asp Pro Phe Asp
 260 265 270

55
 Asp Asp Leu Lys Gln Arg Gly Glu Lys Ser Gly Ile Glu Ile Leu Ser
 275 280 285

60
 Leu Tyr Asp Ala Glu Asn Leu Gly Lys Glu His Phe Arg Lys Pro Val
 290 295 300

65
 Pro Pro Ser Pro Glu Asp Leu Ser Val Ile Cys Phe Thr Ser Gly Thr
 305 310 315 320

70
 Thr Gly Asp Pro Lys Gly Ala Met Ile Thr His Gln Asn Ile Val Ser
 325 330 335

75
 Asn Ala Ala Ala Phe Leu Lys Cys Val Glu His Ala Tyr Glu Pro Thr
 340 345 350

80
 Pro Asp Asp Val Ala Ile Ser Tyr Leu Pro Leu Ala His Met Phe Glu
 355 360 365

85
 Arg Ile Val Gln Ala Val Val Tyr Ser Cys Gly Ala Arg Val Gly Phe

ES 2 368 293 A1

	370		375		380												
5	Phe 385	Gln	Gly	Asp	Ile	Arg 390	Leu	Leu	Ala	Asp	Asp 395	Met	Lys	Thr	Leu	Lys 400	
10	Pro	Thr	Leu	Phe	Pro 405	Ala	Val	Pro	Arg	Leu 410	Leu	Asn	Arg	Ile	Tyr 415	Asp	
15	Lys	Val	Gln	Asn 420	Glu	Ala	Lys	Thr	Pro 425	Leu	Lys	Lys	Phe	Leu 430	Leu	Lys	
20	Leu	Ala	Val 435	Ser	Ser	Lys	Phe	Lys 440	Glu	Leu	Gln	Lys	Gly 445	Ile	Ile	Arg	
25	His	Asp 450	Ser	Phe	Trp	Asp	Lys 455	Leu	Ile	Phe	Ala	Lys 460	Ile	Gln	Asp	Ser	
30	Leu 465	Gly	Gly	Arg	Val	Arg 470	Val	Ile	Val	Thr	Gly 475	Ala	Ala	Pro	Met	Ser 480	
35	Thr	Ser	Val	Met	Thr 485	Phe	Phe	Arg	Ala	Ala 490	Met	Gly	Cys	Gln	Val 495	Tyr	
40	Glu	Ala	Tyr	Gly 500	Gln	Thr	Glu	Cys	Thr 505	Gly	Gly	Cys	Thr	Phe 510	Thr	Leu	
45	Pro	Gly	Asp 515	Trp	Thr	Ser	Gly	His 520	Val	Gly	Val	Pro	Leu 525	Ala	Cys	Asn	
50	Tyr	Val 530	Lys	Leu	Glu	Asp	Val 535	Ala	Asp	Met	Asn	Tyr 540	Phe	Thr	Val	Asn	
55	Asn 545	Glu	Gly	Glu	Val	Cys 550	Ile	Lys	Gly	Thr	Asn 555	Val	Phe	Lys	Gly	Tyr 560	
60	Leu	Lys	Asp	Pro	Glu 565	Lys	Thr	Gln	Glu	Ala 570	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly 575	Trp	
65	Leu	His	Thr	Gly 580	Asp	Ile	Gly	Arg	Trp 585	Leu	Pro	Asn	Gly	Thr 590	Leu	Lys	
70	Ile	Ile	Asp 595	Arg	Lys	Lys	Asn	Ile 600	Phe	Lys	Leu	Ala	Gln 605	Gly	Glu	Tyr	
75	Ile	Ala 610	Pro	Glu	Lys	Ile	Glu 615	Asn	Ile	Tyr	Asn	Arg 620	Ser	Gln	Pro	Val	
80	Leu 625	Gln	Ile	Phe	Val	His 630	Gly	Glu	Ser	Leu	Arg 635	Ser	Ser	Leu	Val	Gly 640	
85	Val	Val	Val	Pro	Asp 645	Thr	Asp	Val	Leu	Pro 650	Ser	Phe	Ala	Ala	Lys 655	Leu	

ES 2 368 293 A1

Gly Val Lys Gly Ser Phe Glu Glu Leu Cys Gln Asn Gln Val Val Arg
660 665 670
5
Glu Ala Ile Leu Glu Asp Leu Gln Lys Ile Gly Lys Glu Ser Gly Leu
675 680 685
10
Lys Thr Phe Glu Gln Val Lys Ala Ile Phe Leu His Pro Glu Pro Phe
690 695 700
15
Ser Ile Glu Asn Gly Leu Leu Thr Pro Thr Leu Lys Ala Lys Arg Gly
705 710 715 720
20
Glu Leu Ser Lys Tyr Phe Arg Thr Gln Ile Asp Ser Leu Tyr Glu His
725 730 735
Ile Gln Asp

25 <210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

30 <220>
<223> cebador directo ACSL1

35 <400> 9

ccagaagggc ttcaagactg 20

40 <210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

45 <220>
<223> cebador inverso ACSL1

50 <400> 10

gccttctctg gcttgtcaac 20

55 <210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

60 <220>
<223> cebador directo ACSL3

65

ES 2 368 293 A1

	<400> 11	
5	tgcacaggcg tgttttatgt	20
	<210> 12	
	<211> 20	
10	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
15	<223> cebador reverso ACSL3	
	<400> 12	
20	ggtggctttc catcaacagt	20
	<210> 13	
25	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
30	<220>	
	<223> cebador directo ACSL4	
	<400> 13	
35	tccaagtttg ggaagaagga	20
	<210> 14	
40	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
45	<220>	
	<223> cebador reverso ACSL4	
50	<400> 14	
	ggcaatggtg ttctttggtt	20
55	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> DNA	
60	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> cebador directo ACSL5	
65		

ES 2 368 293 A1

<400> 15
5 aaggcattgg tgctgatagg 20
<210> 16
<211> 20
10 <212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
15 <223> cebador reverso ACSL5
<400> 16
20 tcaggctcttc tgggctagga 20
<210> 17
25 <211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
30 <220>
<223> cebador directo ACSL6(2)
<400> 17
35 ttcgaagaag ccctgaaaga 20
<210> 18
40 <211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
45 <220>
<223> cebador reverso ACLS6(2)
50 <400> 18
agaaatcagc caccacgttc 20
55 <210> 19
<211> 22
<212> DNA
60 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> cebador directo UbcH5B
65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030630

②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.04.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BIANCA KNOCH et al. "Study of the effects of dietary polyunsaturated fatty acids: Molecular mechanisms involved in intestinal inflammation" GRASAS Y ACEITES, vol 60, no.1, 2009, páginas 8-21. Página 8, columna derecha, segundo párrafo; página 12, columna izquierda apartado 3.1	1-16
A	WO 0208274 A2 (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.) 31.01.2002, página 80, líneas 11-34; página 89, líneas 14-39.	1-16
A	JOSE C. CRISPIN et al. "Phatogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances" TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE vol 16, no. 2, febrero 2010, páginas 47-57. Página 54, columna derecha, penúltimo párrafo.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
24.10.2011

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N9/00 (2006.01)

C12Q1/00 (2006.01)

G01N33/48 (2006.01)

G01N33/564 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12Q, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.10.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	BIANCA KNOCH et al. "Study of the effects of dietary polyunsaturated fatty acids: Molecular mechanisms involved in intestinal inflammation" GRASAS Y ACEITES, vol 60, no.1, 2009, páginas 8-21. Página 8, columna derecha, segundo párrafo; página 12, columna izquierda apartado 3.1	
D02	WO 0208274 A2 (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.)	31.01.2002
D03	JOSE C. CRISPIN et al. "Phatogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances" TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE vol 16, no. 2, febrero 2010, páginas 47-57. Página 54, columna derecha, penúltimo párrafo.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente tal y como ha sido redactada hace referencia al uso de los genes de la familia de las Acil-Coenzima A sintetetas de cadena larga (ACSLs) o de sus productos de expresión, como marcadores para el diagnóstico, pronóstico o seguimiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes (reivindicación 1). La enfermedad inflamatoria o autoinmune se selecciona de entre: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, arteriosclerosis, hipertensión, diabetes no insulina dependiente tipo 2, síndrome metabólico, enfermedad de Crohn o sus combinaciones (reivindicación 2). Siendo la enfermedad inflamatoria o autoinmune preferente el lupus eritematoso sistémico (reivindicación 3). Se reivindica también el método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes (reivindicaciones 4-14) así como el kit de diagnóstico (reivindicación 15) y su uso para el diagnóstico, pronóstico o seguimiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes (reivindicación 16).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA. LP ARTS. 6 Y 8

El documento D01 se refiere al estudio de los efectos de los ácidos grasos poli-insaturados de la dieta y a los mecanismos moleculares implicados en las enfermedades inflamatorias de intestino (IBD: Inflammatory Bowel Diseases), concretamente en la enfermedad de Crohn (véase página 8, columna derecha, segundo párrafo). Se indica que alteraciones en la expresión genética de los genes involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos en IBN puede ser motivo de dicha inflamación. Genes que se encuentran implicados en la activación de los ácidos grasos son los genes de FATP, FABP y ACSL (long chain acyl-CoA synthetases) (véase página 12, columna izquierda apartado 3.1). Se observó que los niveles de mRNA de ACSL1 y ACSL4 se encontraban incrementados en el íleon y colon de pacientes con IBD.

El documento D02 describe moléculas de ácidos nucleicos aisladas (denominadas moléculas de ácidos nucleicos 56939) que codifican nuevos miembros de la familia acyl-CoA tioesterasa. Este ácido nucleico y su proteína pueden usarse para el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades inmunológicas tales como lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, entre otras (véase página 89, líneas 14-29). Dichas moléculas también pueden ser usadas como marcadores (véase página 80, líneas 11-34).

El documento D03 trata sobre la patogénesis del lupus eritematoso sistémico y las recientes contribuciones a partir de diferentes campos que se han ido desarrollando para un mayor conocimiento de dicha enfermedad. Se hace un estudio sobre los genes asociados con la expresión de la enfermedad, sobre el papel de las hormonas y cromosomas sexuales en el desarrollo de la misma, y sobre los factores medioambientales y epigénéticos que contribuyen a la expresión del SLE. También hace referencia a posibles biomarcadores fácilmente evaluables entre los que se incluyen la expresión de CD44 (véase página 54, columna derecha, penúltimo párrafo).

Por lo tanto, ninguno de los documentos citados, considerados solos o en combinación, revelan el uso de los genes de la familia de Acil-Coenzima A sintetasa de cadena larga o de sus productos de expresión, como marcadores para el diagnóstico, pronóstico o seguimiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes. Ni tampoco, en dichos documentos citados existen sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-16, por lo que el objeto de las reivindicaciones 1-16 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo con los arts. 6 y 8 de la LP.