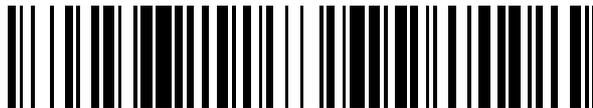


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 670**

21 Número de solicitud: 201230827

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

30.05.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.01.2014

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PRINCESA
(51.0%)
C/ Diego de León, 62
28006 Madrid ES y
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(49.0%)**

72 Inventor/es:

**PÉREZ GOMÁRIZ, Rosa;
MARTÍNEZ MORA, M^a Carmen;
JUARRANZ MORATILLA, Yasmina;
LECETA MARTÍNEZ, Javier;
GONZÁLEZ ÁLVARO, Isidoro y
ORTIZ GARCÍA, Ana María**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Uso de VIP como marcador pronóstico de enfermedades autoinmunes**

57 Resumen:

Uso de vip como marcador pronóstico de enfermedades autoinmunes.

La presente invención se refiere al uso de un producto de expresión del gen VIP como marcador pronóstico de una enfermedad autoinmune, preferiblemente artritis autoinmune, en pacientes previamente diagnosticados de dicha enfermedad autoinmune. La invención también se dirige a un método para el pronóstico de una enfermedad autoinmune, preferiblemente artritis autoinmune, el cual se caracteriza por la determinación de la cantidad de un producto de expresión del gen VIP.

ES 2 436 670 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de VIP como marcador pronóstico de enfermedades autoinmunes.

- 5 La presente invención se refiere al uso del péptido intestinal vasoactivo (VIP) como marcador pronóstico de la evolución de una enfermedad autoinmune, preferiblemente las artritis de origen autoinmune, especialmente de la artritis de reciente comienzo o la artritis reumatoide. Por tanto, la invención se podría encuadrar en el campo de la biomedicina.

10 **ESTADO DE LA TÉCNICA**

15 La artritis reumatoide (AR) es la enfermedad reumática autoinmune más común. Comparte con otras enfermedades autoinmunes, como la psoriasis, la enfermedad inflamatoria intestinal, espondiloartritis o el lupus eritematoso sistémico, una serie de mecanismos etiopatogénicos que ha hecho que se las denomine globalmente como EIMMI (enfermedades inflamatorias mediadas por mecanismos inmunes) y que también comparten su respuesta a tratamientos inmunomoduladores o inmunosupresores similares o iguales.

20 Aunque la variabilidad en el curso clínico de la AR es marcada, dejada a su evolución natural esta enfermedad provoca inflamación crónica de la membrana sinovial de las articulaciones diartrodiales, lo cual causa su progresivo deterioro. Como consecuencia provoca una discapacidad y deterioro de la calidad de vida del paciente. Además, con cierta frecuencia se acompaña de manifestaciones sistémicas y de un aumento en el número de comorbilidades, e incluso de la mortalidad en comparación con la población general (Carmona *et al.* Ann Rheum Dis 2003;62:897-900). Su etiología no ha sido completamente dilucidada, aunque se acepta que es la consecuencia de la influencia de factores ambientales en un huésped genéticamente predispuesto. Su prevalencia oscila entre un 0,3 y un 1%, con un claro gradiente norte-sur de mayor a menor prevalencia (Alamanos and Drosos Autoimmun Rev 2005;4:130-136). En España la prevalencia es de un 0,5% (Carmona *et al.* Ann Rheum Dis 2001;60:1040-1045), lo que supone unos 200.000 pacientes con AR en España. Dada su capacidad para producir incapacidad funcional, la AR es una de las principales causas de incapacidad laboral definitiva en España y a finales de los 90, se estimó que los costes anuales directos de la enfermedad alcanzaban los 14.500 dólares por paciente y año (Lajas *et al.* Arthritis Rheum 2003;49:64-70). Por tanto, se trata de una enfermedad con una gran relevancia económica y social puesto que la edad más frecuente de comienzo de la enfermedad es entre los 35 y los 55 años, momento del mayor aporte en el sector laboral. Pero en pacientes mayores de 65 años también representa un problema económico importante por aumentar la dependencia y los costes indirectos derivados de ésta.

35 Durante los últimos años se ha puesto de manifiesto que el inicio de tratamiento intensivo y precoz con fármacos modificadores de la enfermedad (FAME) puede mejorar este sombrío panorama (Anderson *et al.* Arthritis Rheum 2000; 43:22-29). El establecimiento de consultas específicas de artritis de reciente comienzo ha supuesto un hito en la evolución de la enfermedad, al permitir una derivación más rápida al especialista y el inicio precoz de FAME. De hecho, se ha podido establecer que la implementación de programas para establecer consultas de artritis de reciente comienzo ha mejorado el curso evolutivo de la enfermedad (Descalzo *et al.* Arthritis Care Res (Hoboken) 2012;64:321-330). Aún así, muchos pacientes no alcanzan el estado ideal de remisión, probablemente porque no se establece un tratamiento lo suficientemente intenso desde el inicio, por no poderse determinar la gravedad con la que va a cursar la enfermedad.

45 Como consecuencia de la generalización de las consultas de artritis de reciente comienzo, se han publicado recientemente unos criterios que permiten clasificar como AR de forma más precoz a los pacientes (Aletaha *et al.* Ann Rheum Dis 2010; 69:1580-1588). Aún así, aproximadamente un 40% de los pacientes de estas consultas no cumplen criterios de AR al inicio del seguimiento, a pesar de lo cual, pueden acabar precisando un tratamiento intenso para el control de su enfermedad. Por ello, es importante el desarrollo de marcadores pronósticos de un curso evolutivo de la enfermedad más agresivo, actualmente poco desarrollados, así como de marcadores que predigan la respuesta a determinados fármacos, en la actualidad casi inexistentes. Como consecuencia, el tratamiento se establece siguiendo un esquema de ensayo-error en el que se suele empezar por metotrexato por tener este una buena relación coste/beneficio/efectos adversos, aunque en un número no desdeñable de pacientes esto conduce a una demora en el inicio de un tratamiento eficaz ya que cerca del 40% de los pacientes son refractarios al metotrexato o responden parcialmente.

60 Paradójicamente, frente a esta situación se ha propuesto que el uso precoz de terapias biológicas (anti-TNF, anti-IL6 etc.) podría aumentar el porcentaje de pacientes en los que la enfermedad entra en remisión (Allaart *et al.* J Rheumatol Suppl 2007;80:25-33). Sin embargo, el uso generalizado de este tipo de fármacos resultaría insostenible para cualquier sistema sanitario y expondría, de forma innecesaria, a algunos pacientes a los efectos adversos que las terapias biológicas pueden producir.

65 Por todo ello, se hace necesaria la búsqueda de elementos que permitan determinar cuál va a ser el curso evolutivo de la enfermedad y que, por tanto, permitan determinar precozmente la intensidad del tratamiento adecuada para cada paciente, asumiendo los riesgos de los tratamientos más agresivos para pacientes que vayan a tener un peor pronóstico y evitando estos tratamientos agresivos en los pacientes que vayan a tener una forma leve de la

enfermedad. En este sentido ya se han realizado algunos estudios como por ejemplo el uso de anticuerpos anti-proteínas citrulinadas (Puszczewicz M *et al.* Arch Med Sci 2011; 7(2): 189-194). Sin embargo, este marcador solo aparece en alrededor de un 40 % de pacientes con artritis de reciente comienzo y no es capaz de detectar a todos los pacientes con curso evolutivo desfavorable. Así pues, se hace necesaria la búsqueda de otros marcadores que permitan una mejor determinación del pronóstico de la enfermedad, o que puedan suponer alternativas o complementen los biomarcadores ya disponibles.

Por lo tanto, el desarrollo de test pronósticos que se basen en biomarcadores fácilmente detectables que puedan identificar a los pacientes con peor pronóstico es una necesidad evidente en la reumatología actual. La posibilidad de que algunos de estos biomarcadores puedan detectar a pacientes que respondan mejor o peor a un determinado tratamiento permitiría ahorrar tiempo y costes en el manejo de la AR.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al uso de al menos un producto de expresión de *VIP* como marcador pronóstico de enfermedades autoinmunes, preferiblemente artritis, así como un método para el pronóstico de enfermedades autoinmunes, preferiblemente artritis, y al uso de un kit que comprende al menos un elemento para la cuantificación de al menos un producto de expresión del gen *VIP* para el pronóstico de enfermedades autoinmunes, preferiblemente artritis.

Los autores de la presente invención demuestran que a mayores niveles de *VIP* los pacientes de enfermedades autoinmunes, y de forma más concreta artritis autoinmune, presentan una mejor evolución de la enfermedad. En la presente invención además se muestran datos estadísticos mediante los cuales se demuestra la asociación de los niveles de *VIP* con el nivel de actividad de la artritis autoinmune a lo largo de su seguimiento en una cohorte de pacientes con artritis autoinmune. También se demuestra que los pacientes con artritis autoinmune que de inicio presentan unos mayores niveles de *VIP*, muestran una mejor evolución de la enfermedad con respecto a aquellos pacientes que presentan niveles bajos de *VIP*, demostrando la utilidad de este elemento como marcador pronóstico de la enfermedad. Dado que *VIP* se encuentra codificado por el gen *VIP*, el cual da lugar a transcritos que codifican para *VIP*, estos transcritos presentan la misma utilidad que *VIP* como marcador pronóstico.

Dado que *VIP* tal y como se demuestra en la presente invención permite pronosticar el desarrollo de la artritis autoinmune, y que se encuentra implicado en la modulación de elementos autoinmunes, dicho elemento también es de utilidad como factor pronóstico en otras enfermedades autoinmunes con las que comparte mecanismos etiopatogénicos. Estas enfermedades serían las enfermedades inflamatorias mediadas por mecanismos inmunes o EIMMI y que incluye por ejemplo además de la artritis autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, espondiloartritis o el lupus eritematoso sistémico.

En la presente invención también se describe un método sencillo y preciso de pronóstico de diferentes enfermedades autoinmunes. Dicho método requiere la determinación de la cantidad de al menos un producto de expresión del gen *VIP*, es decir, la cantidad de mRNA o del péptido *VIP* (péptido intestinal vasoactivo) en una muestra biológica. La cantidad de, al menos, un producto de expresión del gen *VIP* puede determinarse mediante diversos procedimientos técnicos conocidos en el estado de la técnica.

El pronóstico debe ser realizado, de forma preferible, aunque sin limitarse, en el primer año del inicio de los síntomas de la enfermedad autoinmune, incluso antes de que se establezca definitivamente el diagnóstico definitivo de la enfermedad. De cualquier forma, el método también puede ser aplicado a lo largo de cualquier momento del desarrollo de la enfermedad. También de forma preferible el método de la invención se aplica en pacientes sin tratamiento, ya que algunos fármacos pueden modificar los niveles de los productos de expresión del gen *VIP*, por lo que idealmente debería ser usado antes de iniciar tratamiento con fármacos inmunomoduladores.

La determinación del nivel de expresión de al menos un producto de expresión del gen *VIP* permite disponer de información útil para la toma de decisiones terapéuticas, permitiendo seleccionar a los pacientes con mayor probabilidad de necesitar un tratamiento intenso. Esto deriva en un abaratamiento de los costes directos e indirectos de la enfermedad y una mejora de la calidad de vida del paciente.

Por todos estos motivos, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de, al menos, un producto de expresión del gen *VIP* como marcador pronóstico de una enfermedad autoinmune en un sujeto previamente diagnosticado de dicha enfermedad. En una realización preferida la enfermedad autoinmune se selecciona de la lista que comprende artritis autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, espondiloartritis o el lupus eritematoso sistémico. En una realización más preferida la enfermedad autoinmune es artritis autoinmune. En una realización aun más preferida la artritis autoinmune es artritis de reciente comienzo o artritis reumatoide.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un producto de expresión del gen *VIP* como marcador pronóstico de una enfermedad autoinmune, preferiblemente artritis autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, espondiloartritis o lupus eritematoso sistémico, más preferiblemente artritis autoinmune, y aun más preferiblemente artritis de reciente comienzo o artritis reumatoide en un sujeto previamente

5 diagnosticado de la enfermedad donde el producto de expresión es mRNA. Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un producto de expresión del gen *VIP* como marcador pronóstico de una enfermedad autoinmune, preferiblemente artritis autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, espondiloartritis o lupus eritematoso sistémico, más preferiblemente artritis autoinmune, y aun más preferiblemente artritis de reciente comienzo o artritis reumatoide en un sujeto previamente diagnosticado de la enfermedad, donde el producto de expresión es *VIP*.

10 Se entiende por "*VIP*" en la presente invención aquel gen que presente capacidad de codificar para *VIP*. De cualquier forma el gen puede ser, por ejemplo, aunque sin limitarse, el gen *VIP* con número de acceso al GenBank del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) AH003027.

15 Se entiende por "mRNA producto del gen *VIP*" en la presente invención, por ejemplo, aunque sin limitarse, el mRNA con número de acceso al GenBank del NCBI NM_003381, y cuya traducción da lugar al péptido intestinal vasoactivo o *VIP*.

El término "péptido intestinal vasoactivo" o "*VIP*" en la presente invención, se refiere al péptido con número de acceso al GenBank del NCBI AAB22264.1 de secuencia aminoacídica SEQ ID NO:1 (hsdavftdny trlrqmkavk kylnsiln).

20 Los términos "secuencia de aminoácidos", "péptido" o "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden estar, o no, química o bioquímicamente modificados. El término "residuo" corresponde a un aminoácido.

25 Por otro lado, un segundo aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* de pronóstico de una enfermedad autoinmune, preferiblemente artritis autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, espondiloartritis o lupus eritematoso sistémico, más preferiblemente artritis autoinmune, y aun más preferiblemente artritis de reciente comienzo o artritis reumatoide caracterizado porque comprende la cuantificación de al menos producto de expresión del gen *VIP* en una muestra biológica aislada de un sujeto que padece la enfermedad autoinmune.

30 El término "*in vitro*" tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a que el método de la invención se realiza fuera del cuerpo del sujeto.

35 Se entiende por "enfermedad autoinmune" en la presente invención aquella enfermedad en la cual uno o varios tipos celulares de un individuo son atacados por el sistema inmune del propio individuo ya que reconoce dichos tipos celulares como elementos extraños. Esto provoca el deterioro e incluso la destrucción de uno o varios tejidos del individuo.

40 El término "enfermedad inflamatoria intestinal" o "EII" en la presente invención se refiere a la inflamación crónica del intestino en un individuo, donde dicha inflamación es debida al sistema inmune del propio individuo. Las dos formas más frecuentes corresponden a la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.

45 En la presente invención se entiende por "psoriasis" aquella enfermedad cutánea la cual está caracterizada por un mal funcionamiento del sistema inmune, lo que provoca un exceso de producción de células cutáneas. Esta enfermedad da lugar a la formación de abultamientos rojizos cubiertas de descamaciones. Además, el exceso de producción de células también produce la infiltración de glóbulos blancos en la piel. Las lesiones de forma general se localizan en regiones con un mayor rozamiento, como por ejemplo, aunque sin limitarse, los codos, las rodillas o ingles.

50 Se entiende por "espondiloartritis" en la presente invención como aquellas enfermedades autoinmunes con afectación axial y/o periférica que cumplen los criterios de clasificación de la *Assessment of SpondyloArthritis International Society* (ASAS o Sociedad Internacional de Evaluación de Espodiloartritis) (Rudwaleit et al. *Ann Rheum Dis* 2009;68:777-783; Rudwaleit et al. *Ann Rheum Dis* 2011;70:25-31).

55 Se entiende por "lupus eritematoso sistémico" en la presente invención aquella enfermedad autoinmune sistémica definida por los criterios del Colegio Americano de Reumatología (Tan et al. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-1277)

En la presente invención el término "artritis autoinmune" englobaría tanto los términos Artritis Reumatoide como Artritis Indiferenciada tanto si es de reciente comienzo como si está bien establecida.

60 Se entiende por "Artritis de Reciente Comienzo o ARC" en la presente invención, aquella enfermedad consistente en inflamación de al menos una articulación, de menos de un año de evolución que cumple los criterios preestablecidos por el Colegio Americano de Reumatología (*American College of Rheumatology* o ACR) y la Liga Europea Contra el Reumatismo (*European League Against Rheumatism* o EULAR) de "Artritis reumatoide o AR" (Aletaha, Neogi et al. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1580-1588) o, que sin cumplir dichos criterios, no cumple criterios de otras enfermedades autoinmunes, degenerativas o metabólicas que puedan explicar los síntomas. Este último caso, viene siendo denominado "Artritis Indiferenciada o AI" que, en muchos de los casos, dejados a su libre evolución, acaban

desembocando en una AR (van der Helm-van Mil *et al.* Arthritis Rheum. 2007;56:433-440). La definición de Artritis Indiferenciada está ganando progresivamente aceptación, ya que se entiende que cuanto más precozmente se trate a los pacientes más opciones de inducir remisión tenemos y en la actualidad se acepta establecer tratamiento inmunomodulador en pacientes que no cumplen criterios de AR. En esta invención los términos ARC, AR o AI hacen referencia a una enfermedad sistémica autoinmune crónica y progresiva, la cual provoca la inflamación crónica fundamentalmente de las articulaciones, y que dada su naturaleza progresiva, produce la destrucción de las mismas, con su consecuente deformación y pérdida de capacidad funcional. Además, esta enfermedad puede provocar alteraciones extraarticulares en diversos órganos (Carmona, Gonzalez-Alvaro *et al.* Ann Rheum Dis 2003;62:897-900). La actividad de la enfermedad se puede determinar mediante índices compuestos que proporcionan un número que aglutina la información de diferentes variables clínicas y analíticas como el DAS (van der Heide *et al.* J Rheumatol 1993;20:579-581), DAS28 (Prevoo *et al.* Arthritis Rheum 1995;38:44-48), SDAI, CDAI (Smolen *et al.* Rheumatology (Oxford) 2003;42:244-257) y otros.

En la presente invención se entiende por “pronóstico” la capacidad de determinar en pacientes de una enfermedad autoinmune, cómo va a evolucionar dicha enfermedad en cuanto a su gravedad. El término “pronóstico” también se refiere a la capacidad de detectar sujetos ya diagnosticados de una enfermedad autoinmune con alta probabilidad de sufrir un empeoramiento de la enfermedad. Esta mala evolución puede definirse de forma concreta como una menor posibilidad de alcanzar la remisión de la enfermedad, teniendo en cuenta que existen múltiples formas de definir este estado ideal de remisión en cada enfermedad.

Por ejemplo en la artritis existen diferentes formas de definir el estado ideal de remisión, como por ejemplo aunque sin limitarse los descritos en Felson *et al.* Arthritis Rheum 2011;63:573-586. Otras situaciones que también pueden considerarse mala evolución son no alcanzar un estado de mínima actividad de la enfermedad (Wells *et al.* J Rheumatol 2005;32:2016-2024) o como la posibilidad de tener peor respuesta terapéutica bien según criterios ACR20, 50 o 70 (Felson *et al.* Arthritis Rheum 1995;38:727-735; Felson J Rheumatol 2004;31:835-837) o según criterios EULAR (van Gestel *et al.* Arthritis Rheum 1996;39:34-40).

El término “muestra biológica aislada” en la presente invención se refiere a cualquier muestra que permita determinar los niveles de VIP del individuo del que se ha obtenido dicha muestra, e incluye, pero sin limitarnos, fluidos biológicos de un individuo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. La muestra biológica podría ser, por ejemplo, pero sin limitarse, una muestra de fluido, como sangre, plasma, suero, líquido sinovial o linfa. Dentro de las muestras biológicas unas de las que presentan mayor utilidad son el suero o el plasma ya que proporcionan datos más precisos de los niveles de VIP. Otras muestras de interés serían por ejemplo células mononucleares de sangre periférica, preferentemente linfocitos T, ya que son las que presentan mayor expresión y por tanto permiten una determinación más sencilla de los niveles. La sangre además se extrae de forma rutinaria en análisis que se pueden realizar periódicamente a los pacientes. Por ello, preferentemente la muestra es sangre, plasma o suero. También resultan útiles muestras de tejido obtenidas que se puedan analizar por ejemplo mediante inmunohistoquímica, o que se puedan homogeneizar para obtener el mRNA de la transcripción del gen *VIP* o *VIP* para poder cuantificarlos. Un ejemplo es la membrana sinovial, la cual procede del tejido concreto afectado por la enfermedad, y por tanto resulta interesante para la determinación de un producto de expresión del gen *VIP*.

Por todo ello, en una realización preferida del segundo aspecto de la invención, la muestra biológica aislada es sangre, suero, plasma o membrana sinovial. En una realización más preferida, la muestra biológica es suero.

Asimismo, la muestra biológica puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina.

En la presente invención se muestra también, que la combinación de la cuantificación de al menos un producto de expresión del gen *VIP* en una muestra biológica aislada con otras variables clínicas, o marcadores ayudan o complementan la utilidad de la cuantificación de al menos un producto de expresión del gen *VIP* en el pronóstico de la enfermedad. Estas variables o marcadores, pueden ser por ejemplo, aunque sin limitarse el sexo del paciente, el estado de actividad al inicio de la enfermedad, así como otras conocidas por el experto en la materia. Un ejemplo de estas variables clínicas útiles es, por ejemplo, aunque sin limitarse, los anticuerpos antipeptidos citrulinados (ACPA) en caso de estarse estudiando la artritis de reciente comienzo o artritis reumatoide. Estos anticuerpos han sido previamente descritos y tienen cierta utilidad en el pronóstico de la artritis.

Por todo ello, en otra realización preferida del segundo aspecto de la invención, el método puede comprender además de la determinación de la cantidad de producto de expresión del gen *VIP* en una muestra biológica aislada de un sujeto que padece una enfermedad autoinmune, preferiblemente artritis autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, espondiloartritis o lupus eritematoso sistémico, más preferiblemente artritis autoinmune, y aun más preferiblemente artritis de reciente comienzo o artritis reumatoide en un sujeto previamente diagnosticado de la enfermedad autoinmune, la determinación de otras variables clínicas, o marcadores. En una realización más preferida del segundo aspecto de la invención, las variables clínicas o marcadores son el sexo del paciente, el estado de actividad al inicio de la enfermedad. Otra realización preferida del segundo aspecto de la invención, se refiere a un método *in vitro* de pronóstico de artritis autoinmune, preferiblemente artritis de reciente comienzo o

artritis reumatoide caracterizado porque comprende la cuantificación de al menos producto de expresión del gen *VIP* en una muestra biológica aislada de un sujeto que padece la artritis autoinmune y que además comprende la determinación del sexo del sujeto, la presencia de anticuerpos antipéptidos citrulinados (ACPA) y/o el estado de actividad al inicio de la enfermedad.

5 Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el pronóstico de una enfermedad autoinmune, preferiblemente artritis autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, espondiloartritis o lupus eritematoso sistémico, más preferiblemente artritis autoinmune, y aun más preferiblemente artritis de reciente comienzo o artritis reumatoide en un sujeto previamente diagnosticado de la enfermedad autoinmune que comprende las siguientes etapas:

- 10 a. cuantificar al menos un producto de expresión del gen *VIP* en una muestra biológica aislada de un sujeto que padece una enfermedad autoinmune, preferiblemente artritis autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, espondiloartritis o lupus eritematoso sistémico, más preferiblemente artritis autoinmune, y aun más preferiblemente artritis de reciente comienzo o artritis reumatoide,
- 15 b. comparar el valor obtenido en el paso (a) con una cantidad de referencia, y
- c. asociar al individuo del paso (a) al grupo de pacientes con mal pronóstico de la enfermedad autoinmune cuando la cantidad cuantificada en el paso (a) es menor que el percentil 50 de la cantidad de referencia del paso (b).

20 En los ejemplos de la presente invención se muestra que la comparación con el percentil 50 de cantidad de referencia, presenta utilidad a la hora de clasificar los pacientes. Además se demuestra que según se va reduciendo este percentil, el valor es más restrictivo y por tanto permite una mejor clasificación, y una mayor seguridad en la clasificación de los mismos. Ejemplos de estos percentiles más restrictivos y que presentan utilidad serían por ejemplo, aunque sin limitarse, el percentil 25 o el percentil 10. Por todo esto, en una realización preferida del tercer aspecto de la invención, en el paso (c) se asocia al individuo del paso (a) al grupo de pacientes con mal pronóstico de la enfermedad autoinmune cuando la cantidad cuantificada en el paso (a) es menor que el percentil 25 de la cantidad de referencia del paso (b). En una realización más preferida del tercer aspecto de la invención, en el paso (c) se asocia al individuo del paso (a) al grupo de pacientes con mal pronóstico de la enfermedad autoinmune cuando la cantidad cuantificada en el paso (a) es menor que el percentil 10 de la cantidad de referencia del paso (b).

30 El término "cantidad de referencia", tal y como se utiliza en el paso (b), se refiere a cualquier valor o rango de valores derivado de la cuantificación de un producto de expresión del gen *VIP* en una colección de muestras biológicas procedente de individuos sanos y que son representativos de la población en la que se va a aplicar el test. Esta muestra también puede ser una mezcla de muestras biológicas obtenidas de diferentes sujetos sanos. La cantidad de referencia se ha de medir de la misma forma, y ser obtenida en el mismo tipo de muestra biológica aislada que la cantidad de interés en los pacientes. Por ello en una realización preferida de este aspecto de la invención la cantidad de referencia del paso (b) es la cantidad de *VIP* en una colección de muestras biológicas aislada de individuos que no presentan enfermedades autoinmunes.

40 Se entiende por "sano" "individuo sano" o "sujeto sano" en la presente invención aquel sujeto o individuo que no padece ninguna enfermedad autoinmune.

45 Se entiende por "población sana" en la presente invención, un conjunto de individuos que no presentan enfermedades autoinmunes.

50 Se entiende por "individuos sanos representativos de la población en la que se va a aplicar el test" a aquellas personas que no padecen enfermedades autoinmunes en el momento de la extracción y que como grupo tienen un patrón similar en cuanto a raza, edad, distribución por género que la población de pacientes a los que se va a aplicar el test.

55 La cuantificación de la cantidad de un producto de expresión del gen *VIP* en una muestra biológica aislada se refiere a la cuantificación del mRNA, del ADN complementario (ADNc) a este ARNm, y/o de la proteína *VIP* en una muestra biológica aislada. La cuantificación por tanto se puede realizar determinando el nivel de mRNA 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. Para ello la muestra biológica aislada puede tratarse física o mecánicamente para romper el tejido o las estructuras celulares y liberar los componentes intracelulares a una solución acuosa u orgánica para preparar los ácidos nucleicos para un posterior análisis. Los ácidos nucleicos se extraen de la muestra por procedimientos conocidos por el experto en la materia y comercialmente disponibles. La determinación del nivel de mRNA derivado de la transcripción de *VIP* 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. Por todo ello en una realización preferida de este aspecto de la invención el producto de expresión cuantificado en el paso (a) es mRNA.

La cuantificación por otro lado también se puede realizar determinando el nivel de proteína VIP derivado de la traducción de los mRNA transcritos a partir del gen. Esta cuantificación proteica se puede realizar mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin, como por ejemplo, pero sin limitarnos, métodos de inmunodetección (como *western blot*, ELISA, inmunohistoquímica), métodos basados en marcajes isobáricos (como iTRAQ *-isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation-*, o ICAT *-Isotope Coded Affinity Tag-*) o en marcajes isotópicos (como SILAC *-Stable Isotopes Labeling by Amino Acids in Cell Culture-*) o basados en marcajes fluorescentes (como 2D-DIGE *-Difference in Gel Electrophoresis-*), así como métodos basados en espectrometría de masas (MRM, *-Multiple Reaction Monitoring-*). Por todo ello en otra realización preferida de este aspecto de la invención el producto de expresión cuantificado en el paso (a) es VIP.

Se entiende por "sujeto" en la presente invención aquel individuo susceptible de padecer una enfermedad autoinmune. Preferiblemente el sujeto es un humano.

En otra realización preferida del tercer aspecto de la invención la muestra biológica se selecciona de entre sangre, plasma, suero, o membrana sinovial. En una realización más preferida, la muestra biológica es suero.

Otra realización preferida del tercer aspecto de la invención se refiere al método donde el sujeto es un humano.

Cualquiera de los pasos de los métodos de la invención pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, pero sin limitarnos, por medio de un equipo robótico sensor para la obtención de las cantidades de los productos de expresión del gen *VIP* en el paso (a), o la comparación computerizada en el paso (b) del tercer aspecto de la invención. Además de los pasos especificados anteriormente, los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender otros pasos adicionales, por ejemplo, relacionados con el pre-tratamiento de la muestra o con la extracción del material proteico y/o genético necesario para su posterior análisis.

El tercer aspecto de la invención puede comprender además la determinación de otras variables clínicas, o marcadores como por ejemplo, aunque sin limitarse, sexo, el estado de actividad al inicio de la enfermedad que ayuden o complementen el pronóstico de la enfermedad. Además, en el caso de tratarse de artritis autoinmune, se puede utilizar como variable clínica además la presencia de anticuerpos antipeptidos citrulinados. Por todo ello, en una realización preferida del tercer aspecto de la invención, el método comprende además la determinación del sexo del sujeto, y/o el estado de actividad al inicio de la enfermedad. En otra realización preferida del tercer aspecto de la invención, en el caso de tratarse de artritis autoinmune, el método comprende además la determinación del sexo del sujeto, la presencia de anticuerpos antipeptidos citrulinados y/o el estado de actividad al inicio de la enfermedad.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de un kit que comprende los elementos necesarios para determinar la cantidad de VIP para la obtención de datos útiles para el pronóstico de una enfermedad autoinmune preferiblemente artritis de reciente comienzo, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis o lupus eritematoso sistémico, y más preferiblemente artritis de reciente comienzo o artritis reumatoide previamente diagnosticado de la enfermedad autoinmune.

En la presente descripción se entiende por "elementos adecuados para cuantificar un producto de expresión del gen *VIP*" los cebadores, sondas, anticuerpos poli o monoclonales, específicos del gen *VIP* o de sus mRNA, o de VIP, y todos aquellos reactivos necesarios para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención descritos anteriormente en este documento. Los kits además pueden incluir, sin ningún tipo de limitación, el uso de tampones, enzimas, enzimas polimerasas, cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado los kits pueden incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Los kits pueden contener además otras moléculas, genes, proteínas o sondas de interés, que sirvan como controles positivos y negativos. Preferiblemente, los kits comprenden además las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.

En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención, el kit comprende sondas que permiten la determinación de la cantidad de mRNA transcritos a partir del gen *VIP* para el pronóstico de una enfermedad autoinmune, preferiblemente artritis autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, espondiloartritis o lupus eritematoso sistémico, más preferiblemente artritis autoinmune, y aun más preferiblemente artritis de reciente comienzo o artritis reumatoide previamente diagnosticado de la enfermedad autoinmune.

En otra realización preferida del cuarto aspecto de la invención, el kit comprende anticuerpos que permiten la determinación de la cantidad de VIP para el pronóstico de una enfermedad autoinmune, preferiblemente artritis autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, espondiloartritis o lupus eritematoso sistémico, más preferiblemente artritis autoinmune, y aun más preferiblemente artritis de reciente comienzo o artritis reumatoide previamente diagnosticado de la enfermedad autoinmune. Preferiblemente, el sujeto es un humano.

El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, enzimas, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. El kit puede contener además otras moléculas, anticuerpos anticuerpos, o proteínas, que sirvan como controles positivos y negativos o para la normalización de los valores obtenidos. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.

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

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Variabilidad de los niveles de VIP en controles sanos y pacientes con artritis reumatoide o artritis indiferenciada. Los datos se muestran como la mediana (línea horizontal dentro de las cajas), los percentiles 25 y 75 (líneas inferior y superior de las cajas respectivamente) y los percentiles 10 y 90 (pequeñas líneas horizontales al final de las líneas verticales por debajo y encima de las cajas respectivamente). Los puntos representan valores fuera de rango. La línea horizontal en trazo discontinuo se refiere al percentil 25 de la población sana.

FIG. 2. Relación de los niveles de VIP con el género (A), la edad (B) y la actividad de la enfermedad (DAS28) (C). Los datos se muestran como la mediana (línea horizontal dentro de las cajas), los percentiles 25 y 75 (líneas inferior y superior de las cajas respectivamente) y los percentiles 10 y 90 (pequeñas líneas horizontales al final de las líneas verticales por debajo y encima de las cajas respectivamente) en el caso de la figura A. En las figuras B y C, se representan los diferentes puntos con la recta de regresión estimada (línea negra continua), así como el intervalo de confianza al 95% (zona gris alrededor de la línea negra).

FIG. 3. Niveles de VIP ajustado en las visitas inicial (primera columna), a los 6 meses (segunda columna), a los 12 meses (tercera columna) y a los 24 meses (cuarta columna).

FIG. 4. Niveles de VIP en la visita inicial según el nivel de actividad de la enfermedad (según DAS28) en las visitas a los 2 (A) y 5 (B) años de seguimiento. En el panel C se muestra el grado de actividad de la artritis (DAS28) en la visita inicial y tras dos y cinco años de seguimiento en los pacientes que tienen VIP alto (cajas blancas) o bajo (cajas grises).

FIG. 5. Intensidad de tratamiento en los pacientes estudiados según presenten niveles de VIP alto o bajo en la primera visita del seguimiento. La intensidad del tratamiento se cuantificó según el número de días con tratamiento con todos los FAME (fármacos modificadores de la enfermedad) que cada paciente ha recibido a lo largo de los dos primeros años de su seguimiento.

FIG. 6. Efecto de la combinación del género (A), la edad (B) y el nivel de actividad al inicio de la enfermedad (C) con los niveles de VIP para predecir el estado de actividad de la enfermedad a los dos años de seguimiento. Los datos se muestran como la mediana (línea horizontal dentro de las cajas), los percentiles 25 y 75 (líneas inferior y superior de las cajas respectivamente) y los percentiles 10 y 90 (pequeñas líneas horizontales al final de las líneas verticales por debajo y encima de las cajas respectivamente) del DAS28 a los dos años de seguimiento en los pacientes que tienen VIP alto (cajas blancas) o bajo (cajas grises).

FIG. 7. Efecto de la positividad de los anticuerpos antipéptidos citrulinados (ACPA) en la capacidad predictiva de los niveles de VIP. A) Actividad de la enfermedad a los dos años de seguimiento. B) Intensidad de tratamiento. Los datos se muestran como la mediana (línea horizontal dentro de las cajas), los percentiles 25 y 75 (líneas inferior y superior de las cajas respectivamente) y los percentiles 10 y 90 (pequeñas líneas horizontales al final de las líneas verticales por debajo y encima de las cajas respectivamente) del DAS28 a los dos años de seguimiento en los pacientes que tienen VIP alto (cajas blancas) o bajo (cajas grises).

FIG. 8. Niveles de VIP antes (cajas blancas) y después (cajas grises) de iniciar los diferentes tratamientos. Hay que reseñar que los pacientes en tratamiento con anti-TNF fueron muy escasos y esa puede ser la causa de que no se alcance significación estadística siendo mayor el efecto observado.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma. A continuación se ilustrará la invención mediante

unos ensayos realizados por los inventores que pone de manifiesto la utilidad de VIP como marcador pronóstico de la evolución de enfermedades autoinmunes.

Ejemplo 1

5 El registro de pacientes con artritis de reciente comienzo del Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario de La Princesa incluye pacientes derivados desde Atención Primaria que presentan una o más articulaciones inflamadas durante un mínimo de cuatro semanas y un máximo de un año de evolución. El único criterio de exclusión es que a lo largo del seguimiento los pacientes sean diagnosticados de artritis microcristalina, artritis sépticas o víricas, espondiloartropatías o enfermedades del tejido conectivo. El protocolo de estudio establece la realización de cuatro visitas en un período de seguimiento de cinco años: una visita basal, a los seis meses, al 10 año, a los dos y a los cinco años. En cada visita se recogen datos demográficos (género, nivel de estudios y estado civil), clínicos (fecha de inicio de la enfermedad, recuento de 28 articulaciones dolorosas [NAD28] y tumefactas [NAT28], la valoración global de la enfermedad por el médico [VGEM] y por el paciente [VGEP] y evaluación del dolor en una escala visual analógica de 0 a 100 mm) y analíticos (velocidad de sedimentación globular [VSG; medida por el método de Westergren], proteína C reactiva [PCR; medida por nefelometría], factor reumatoide [FR; nefelometría niveles de anticuerpos antipéptido cíclico citrulinado [ACPA; determinados por ELISA: immunoscan CCPlus®. Euro-Diagnostica. Arnhem, Holanda] y hemograma y bioquímica básica. La capacidad funcional se estima mediante el cuestionario HAQ en su versión validada para población española (Esteve-Vives *et al.* J Rheumatol 1993;20:2116-2122) y en cada visita se calcula el DAS28 con VSG como ha sido descrito previamente: $0,56*\sqrt{(NAD28)} + 0,28*\sqrt{(NAT28)} + 0,70*\ln(VSG) + 0,014*(VGEP)$ (Prevoo, van't Hof *et al.* Arthritis Rheum 1995;38:44-48). También se realiza una recogida exhaustiva del tipo de fármacos que recibe el paciente para el tratamiento de su artritis, tanto glucocorticoides, como de fármacos modificadores de la enfermedad (FAME). El término FAME incluye a: antimaláricos, metotrexato, leflunomida, sulfasalacina, aurotiomalato, ciclosporina A y terapias biológicas que a su vez comprenden los agentes bloqueantes del TNF, tocilizumab, abatacept y rituximab. De todos estos fármacos se recoge, no solo la dosis, sino también la fecha de inicio y, si procede, de suspensión. Ello nos ha permitido generar una variable, denominada Intensidad de Tratamiento, que es el resultado de sumar el número de días que el paciente ha recibido cada uno de los fármacos en los dos primeros años de tratamiento, ponderados multiplicando por un factor de corrección (relacionado con su eficacia teórica): 1x para antimaláricos, 1'5x para metotrexato, leflunomida, sulfasalacina, aurotiomalato y ciclosporina A y 2x para las terapias biológicas. Esta variable es de gran importancia ya que, en estudios observacionales como el que se describe, la cuantificación de la intensidad del tratamiento se acepta como una variable subrogada de gravedad. El motivo es que, a diferencia de los ensayos clínicos doble ciego en los que hay un protocolo preestablecido que no se puede modificar, en los estudios observacionales se modifica el tratamiento en cada visita según el estado en el que se encuentra el 35 paciente. Además, se recogen muestras de suero, RNA de células mononucleares de sangre periférica y DNA genómico que se procesan adecuadamente para su conservación hasta la realización de diferentes determinaciones. El protocolo del Registro ha sido evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Princesa y todos los pacientes son informados del estudio y firman un consentimiento informado antes de su inclusión en el Registro.

40 Se han estudiado los niveles de VIP en 93 pacientes de esta consulta, en un total de 376 visitas. Así mismo, se han determinado los niveles de VIP en 100 donantes de sangre sanos. La determinación de los niveles de VIP se realiza por medio de un ELISA competitivo de la casa Phoenix Pharmaceuticals, INC. Para llevar a cabo este ensayo, previamente hay que liofilizar las muestras de unos 250 microlitros de suero que posteriormente se diluyen en 120 microlitros de un tampón de ensayo de la misma casa comercial y se añaden a una placa cuyos pocillos están recubiertos con un anticuerpo secundario. Junto con las muestras se carga un anticuerpo primario y VIP biotinilado. Tras dos horas de incubación, el material no unido es retirado por lavados. A continuación se añade estreptavidina conjugada con peroxidasa y en el último paso se agrega el sustrato de la peroxidasa, tetrametilbencidina (TMB). Las muestras desarrollan color azul, que vira a amarillo cuando la reacción se detiene con ácido clorhídrico. Por último, se mide la absorbancia a 450nm. Utilizando una curva estándar, se calcula la concentración de péptido en las muestras, aplicando el correspondiente factor de dilución.

Como inconveniente de este procesado de las muestras hemos obtenido una cierta variabilidad interensayo. Además algunos valores de pacientes concretos tenían una importante dispersión por encima de 1000 pg/ml. Para el análisis de los datos que se presentan a continuación, ambos problemas se han solventado favorablemente mediante herramientas estadísticas. En el primer caso, el alto número de muestras estudiadas ha permitido incluir como variable independiente la placa en la que se determinaba cada grupo de muestras, ajustando así la variabilidad interensayo. En el segundo caso, se ha utilizado una variable censurada en el valor 1000 pg/ml de la curva patrón del ELISA. Utilizando modelos lineales generalizados ello nos ha permitido determinar asociaciones significativas, aunque los coeficientes no dan una información perfecta del grado de asociación de los niveles de VIP con las diferentes variables.

Resultados

65 Como se puede apreciar en la figura 1, la distribución de los valores de VIP es bastante variable en las 3 poblaciones estudiadas: controles sanos, pacientes con AR y con AI. Se han considerado los percentiles 50, 25 y 10

de la población sana como el límite para definir VIP bajo porque este es un proceder común en estadística y epidemiología que divide a la población en dos grupos bien diferenciados. No obstante, algunos análisis se han realizado con la variable continua que proporciona una mayor sensibilidad.

5 El análisis multivariable de los resultados permite determinar que el género no influye en los niveles de VIP (Figura 2A). Por otra parte, se ha observado que existe una pequeña tendencia a aumentar los niveles de VIP con la edad (Figura 2B), aunque esta variación atribuible a la edad es mucho menor que la variabilidad individual de los diferentes pacientes. Por último, hay una correlación inversa entre los niveles de actividad de la artritis y la concentración de VIP en suero. Así pacientes con niveles de VIP más bajos tienden a tener mayores niveles de actividad de la enfermedad (Figura 2C).

15 En relación con la actividad de la enfermedad, es interesante saber si los niveles de VIP varían al hacerlo la actividad de la enfermedad o si se mantienen más o menos estables para cada paciente. Así, se puede observar que no existe una variación significativa de los niveles de VIP a lo largo del seguimiento (figura 3), a diferencia de lo que ocurre con la actividad de la enfermedad que mejora en las visitas sucesivas respecto a la basal como efecto del tratamiento administrado.

20 Por lo tanto, la asociación vista entre niveles de VIP y la actividad de la enfermedad se refiere a que los pacientes con VIP bajo tienden a tener mayor actividad al no ser capaces de incrementar el VIP endógeno (cuya función es la inmunoregulación negativa) en situaciones de inflamación intensa. Por ello se analizaron los niveles de VIP en la visita basal del estudio según la actividad de los enfermos a los dos años de seguimiento. Como se aprecia en la figura 4, los niveles de VIP más bajos en la visita inicial se acumulan entre los pacientes con actividad alta, a pesar del tratamiento, a los dos (Figura 4A) y cinco (figura 4B) años de seguimiento.

25 Por el contrario, los niveles de VIP más elevados se acumularon en los grupos de pacientes con enfermedad en remisión o con actividad baja a los dos ó cinco años de seguimiento. Vista de la forma inversa, en la figura 4C se observa que en la visita inicial los pacientes que tienen similares niveles de actividad tengan VIP alto o bajo, mientras que a los dos ó cinco años de seguimiento los pacientes con VIP bajo tienden a tener mayores valores de DAS28. Por lo tanto, los pacientes con niveles bajos de VIP tienden a tener un peor curso evolutivo a lo largo de la enfermedad, a pesar de que como se muestra en la figura 5 reciben un tratamiento con FAME más intenso que los pacientes con VIP alto.

35 El efecto predictivo de los niveles bajos de VIP pueden verse modulados o potenciados por otras variables de confusión. Como se observa en la figura 6A, las mujeres con VIP bajo tuvieron niveles de actividad a los dos años de seguimiento mayores que los de las mujeres con VIP normal o alto, mientras que estas diferencias fueron menos marcadas en los varones. Por su parte, la edad no interfirió con la capacidad predictiva de VIP (figura 6B). Además, los niveles de actividad en la visita inicial, también pueden modular la capacidad predictiva de los niveles de VIP. La figura 6C pone de manifiesto que no había pacientes en remisión o actividad baja al inicio del seguimiento entre los pacientes con VIP bajo. Estos pacientes se encontraban entre los que tenían actividad moderada o alta. Pero entre estos últimos, aquellos con niveles de VIP bajos eran los que peor se encontraban al final del seguimiento.

45 Más compleja es la interacción con la presencia de ACPA +, ya que este es un reconocido marcador de mal pronóstico y ante su presencia los reumatólogos tienden a ser más agresivos en las pautas de tratamiento. Así, podemos apreciar en la figura 7A que los pacientes con ACPA negativo y VIP bajo tenían mayor nivel de actividad a los dos años de seguimiento que los pacientes ACPA negativo y con VIP normal o alto. Esta diferencia no es tan clara en los pacientes ACPA +. Muy probablemente ello es debido a que todos los pacientes con ACPA positivo recibieron tratamiento más intenso (figura 7B). Posiblemente, los que además tenían VIP bajo, precisaron un tratamiento un poco más intenso. Los pacientes con ACPA negativo y VIP normal o alto precisaron tratamiento menos intenso, mientras que en los pacientes con ACPA negativo y VIP bajo el tratamiento tendió a ser más alto aunque de forma muy heterogénea por no tener marcador de mal pronóstico conocido.

50 Por último, también se estudio si los diferentes fármacos utilizados en el tratamiento de la AR afectan a los niveles de VIP. Como se observa en la figura 8, la prescripción de leflunomida y posiblemente de anti-TNF, podrían ejercer un efecto sobre los niveles de VIP incrementándolos. Sin embargo, este dato precisa un mayor número de pacientes a estudiar pues leflunomida y terapias biológicas suelen utilizarse en segunda línea con pacientes que han fracasado a antimaláricos y/o metotrexato.

60 En conclusión, los pacientes con niveles bajos de VIP tienen un peor curso evolutivo y la determinación de este biomarcador en fases precoces podría ser de utilidad para seleccionar a los pacientes candidatos a pautas terapéuticas más intensa contra la enfermedad.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Uso de al menos un producto de expresión del gen *VIP* como marcador pronóstico de artritis autoinmune en un sujeto que padece artritis autoinmune.
- 2.- Uso según la reivindicación 1 donde el producto de expresión es *VIP*.
- 10 3.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde la artritis autoinmune es artritis de reciente comienzo o artritis reumatoide.
- 4.- Método *in vitro* para el pronóstico de artritis autoinmune caracterizado porque comprende la cuantificación de al menos un producto de expresión del gen *VIP* en una muestra biológica aislada de un sujeto que padece artritis autoinmune.
- 15 5.- Método *in vitro* para el pronóstico de la artritis autoinmune de un sujeto que padece artritis autoinmune que comprende:
- 20 a. cuantificar al menos un producto de expresión del gen *VIP* en una muestra biológica aislada de un sujeto que padece artritis autoinmune,
- b. comparar el valor obtenido en el paso (a) con una cantidad de referencia, y
- c. asociar al individuo del paso (a) al grupo de pacientes con mal pronóstico de artritis autoinmune cuando la cantidad cuantificada en el paso (a) es menor que el percentil 50 de la cantidad de referencia del paso (b).
- 25 6.- Método según la reivindicación 5 donde en el paso (c) se asocia al individuo del paso (a) al grupo de pacientes con mal pronóstico de artritis autoinmune cuando la cantidad cuantificada en el paso (a) es menor que el percentil 25 de la cantidad de referencia del paso (b).
- 30 7.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6 donde en el paso (c) se asocia al individuo del paso (a) al grupo de pacientes con mal pronóstico de artritis autoinmune cuando la cantidad cuantificada en el paso (a) es menor que el percentil 10 de la cantidad de referencia del paso (b).
- 8.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 donde la muestra biológica aislada es suero, plasma o membrana sinovial.
- 35 9.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8 que además comprende la determinación del sexo del sujeto, la presencia de anticuerpos antipeptidos citrulinados y/o el estado de actividad al inicio de la enfermedad.
- 10.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 donde el producto de expresión del gen *VIP* es *VIP*.
- 40 11.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10 donde el sujeto es humano.
- 12.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11 donde la artritis autoinmune es artritis de reciente comienzo o artritis reumatoide.
- 45 13.- Uso de un kit que comprende anticuerpos específicos para *VIP* para la realización de un método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 12.
- 14.- Uso de un kit que comprende sondas que permiten la determinación de la cantidad de mRNA transcrito a partir del gen *VIP* para la realización de un método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 12.

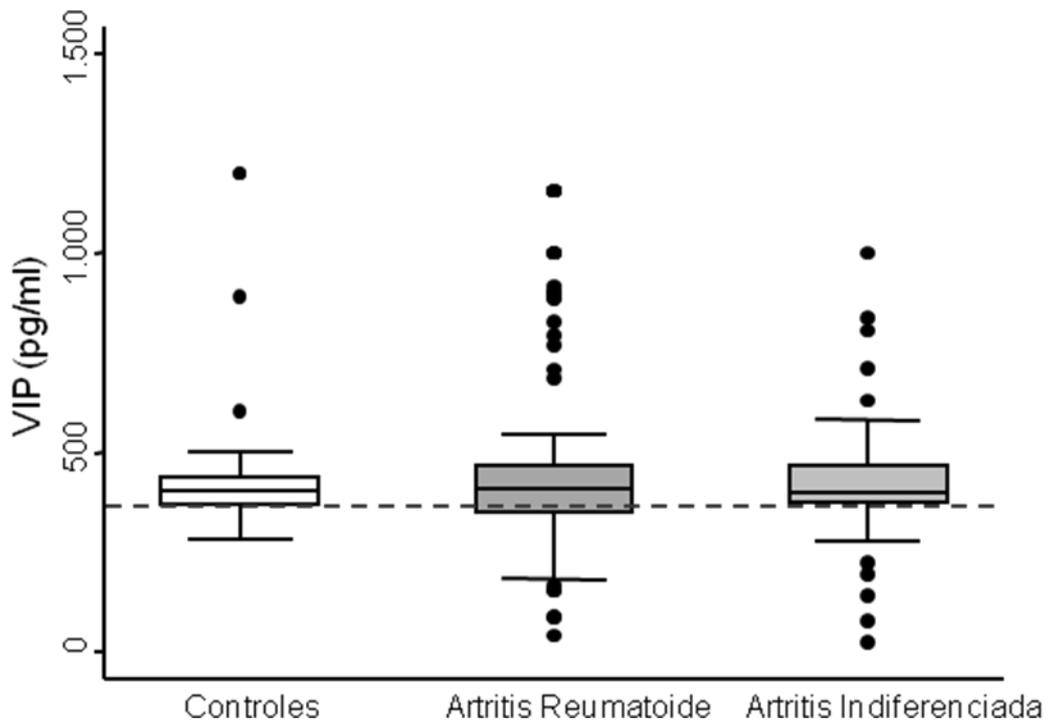


FIG.1

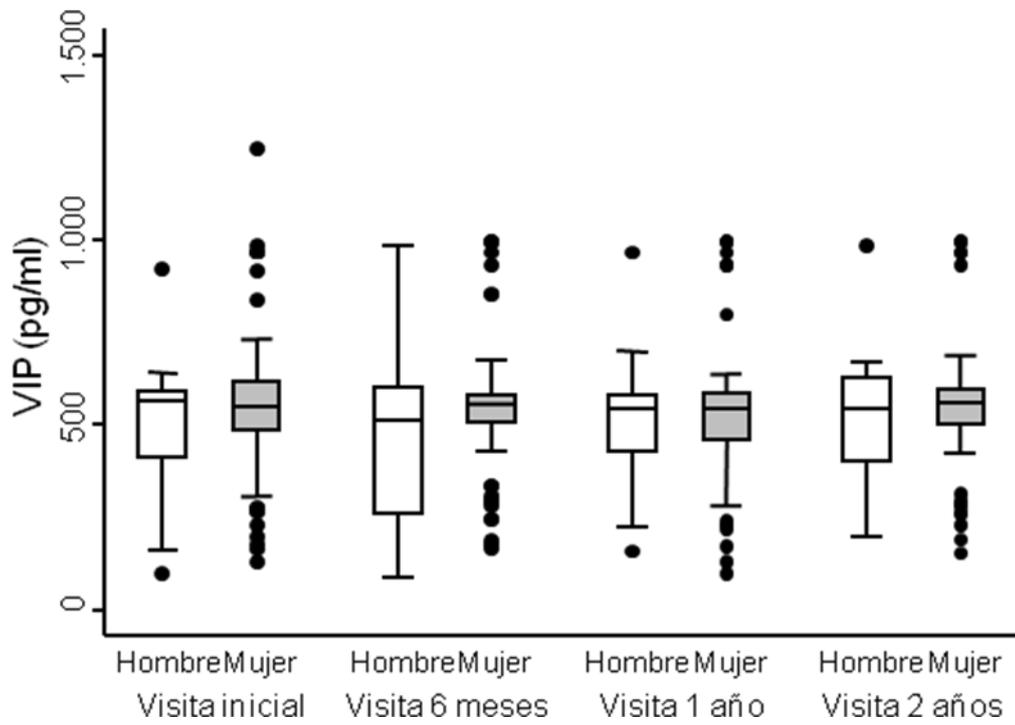


FIG.2

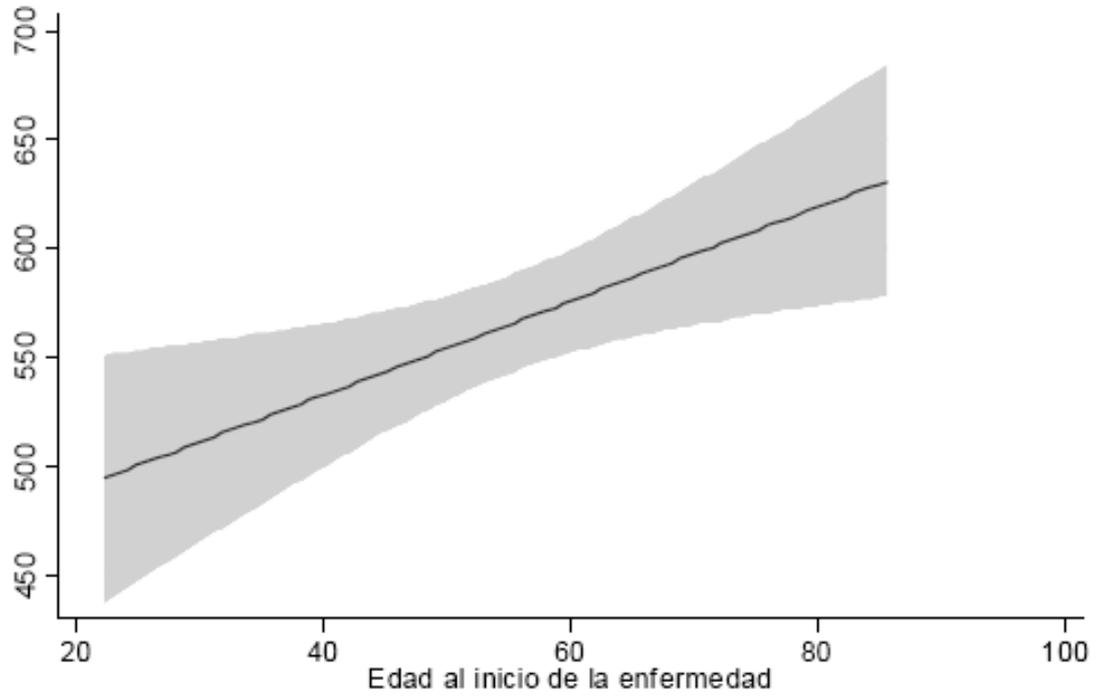


FIG.2B

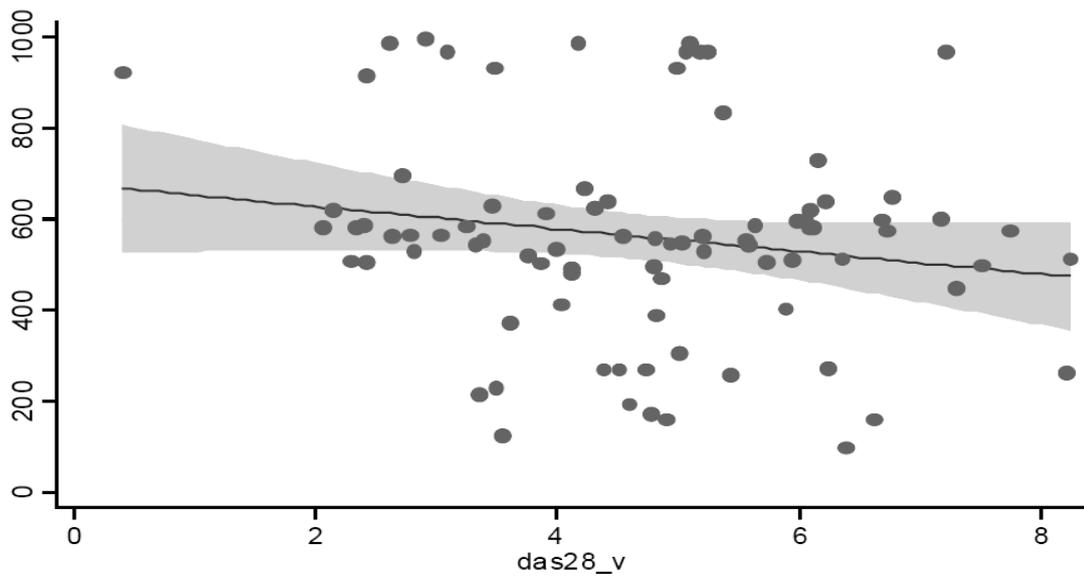


FIG 2C

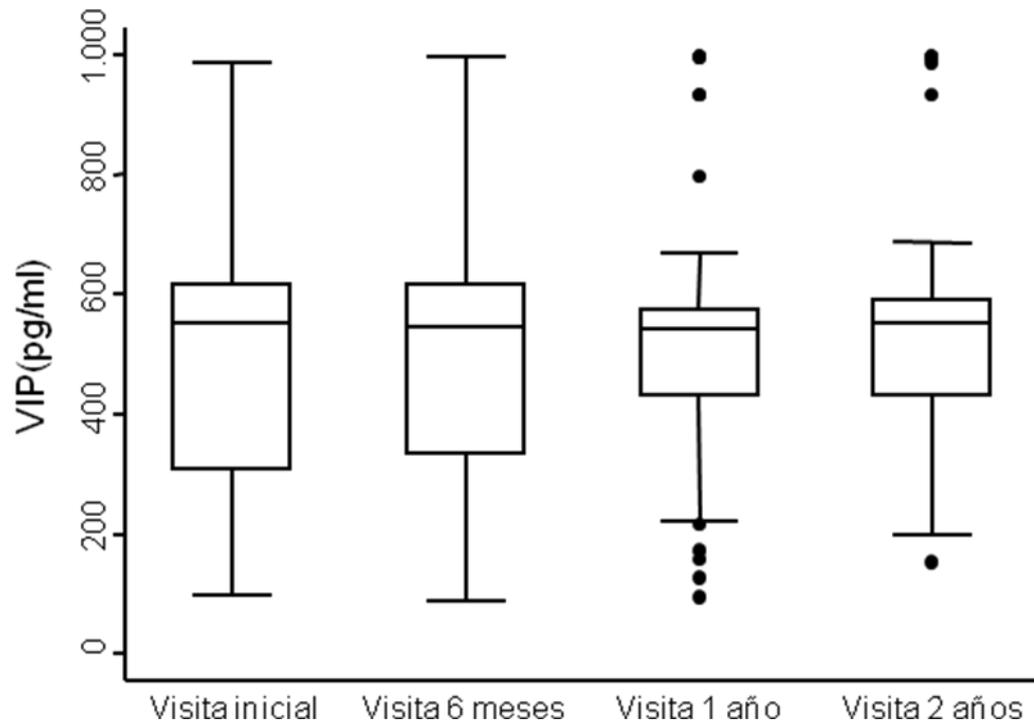


FIG. 3

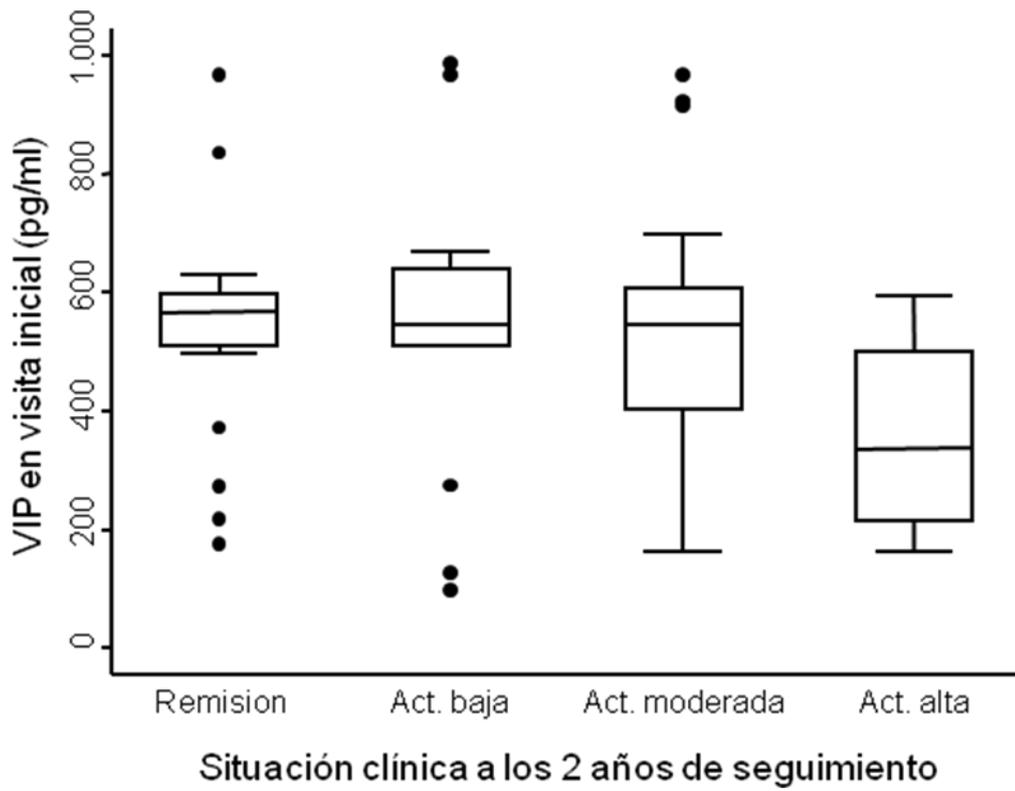


FIG. 4A

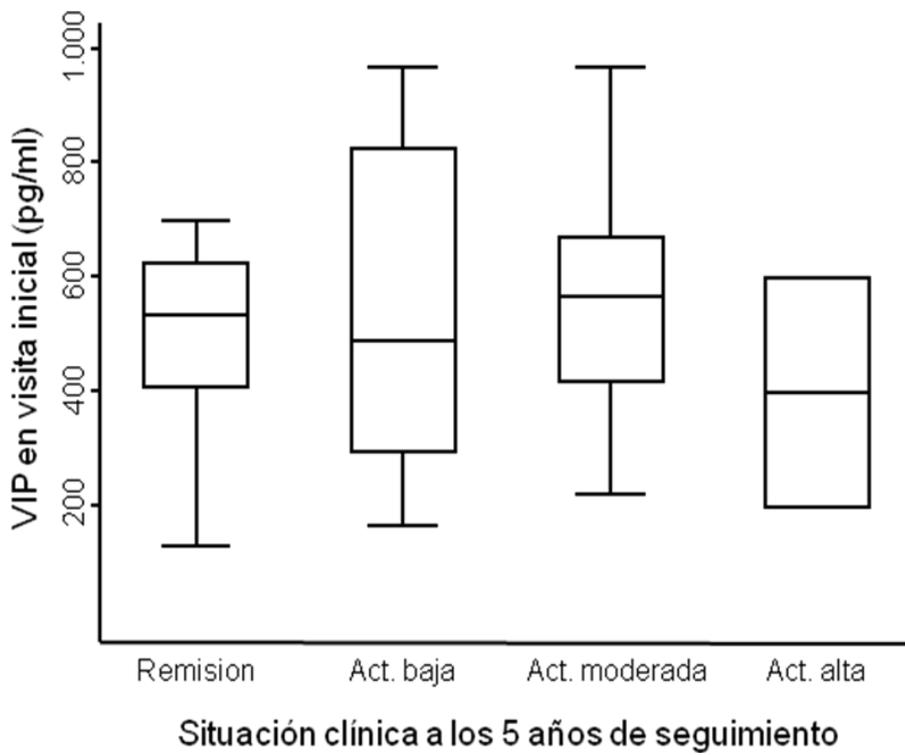


FIG. 4B

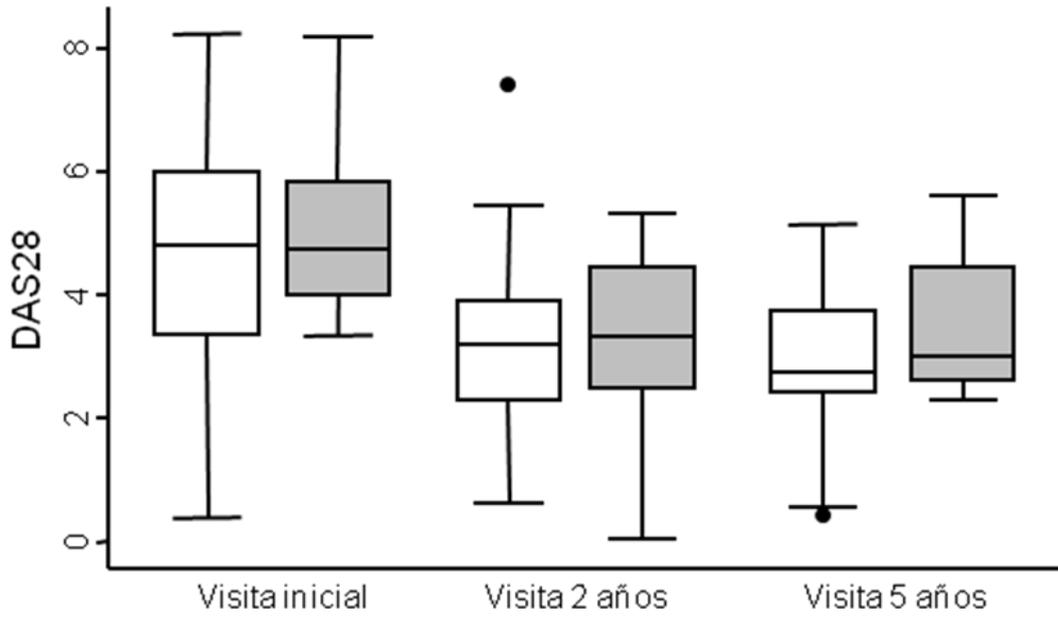


FIG. 4C

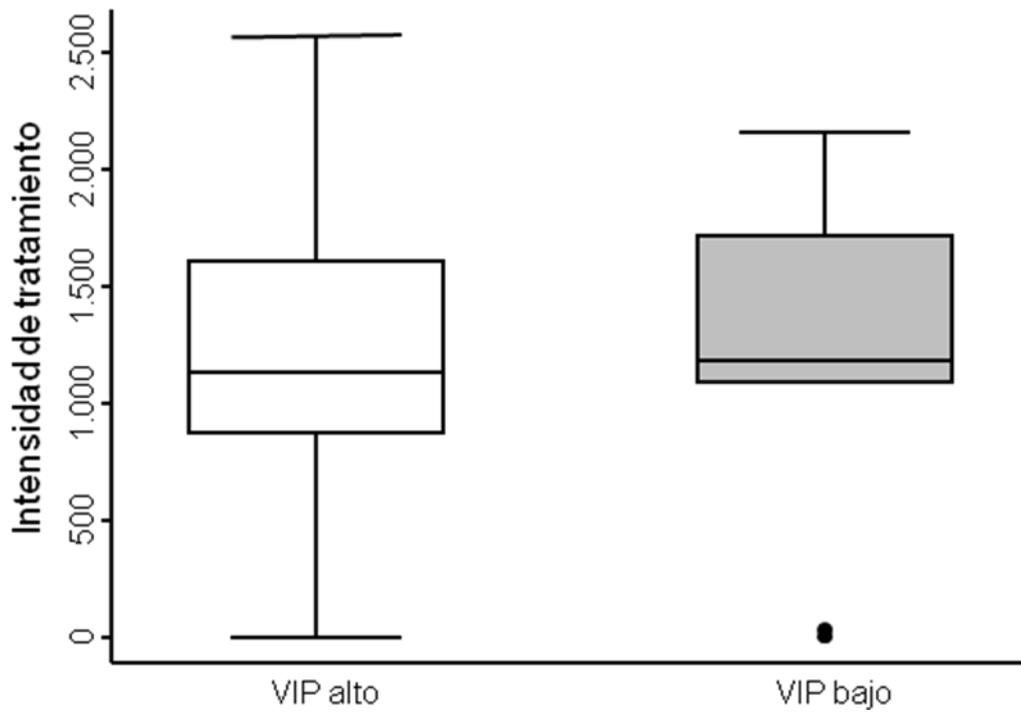


FIG. 5

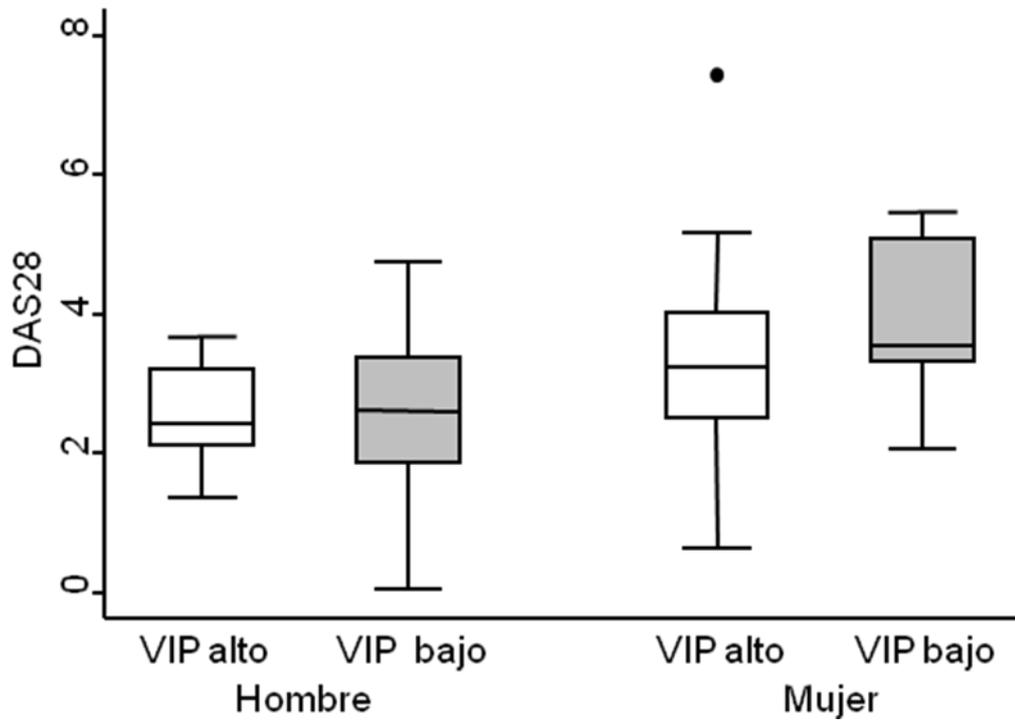


FIG. 6A

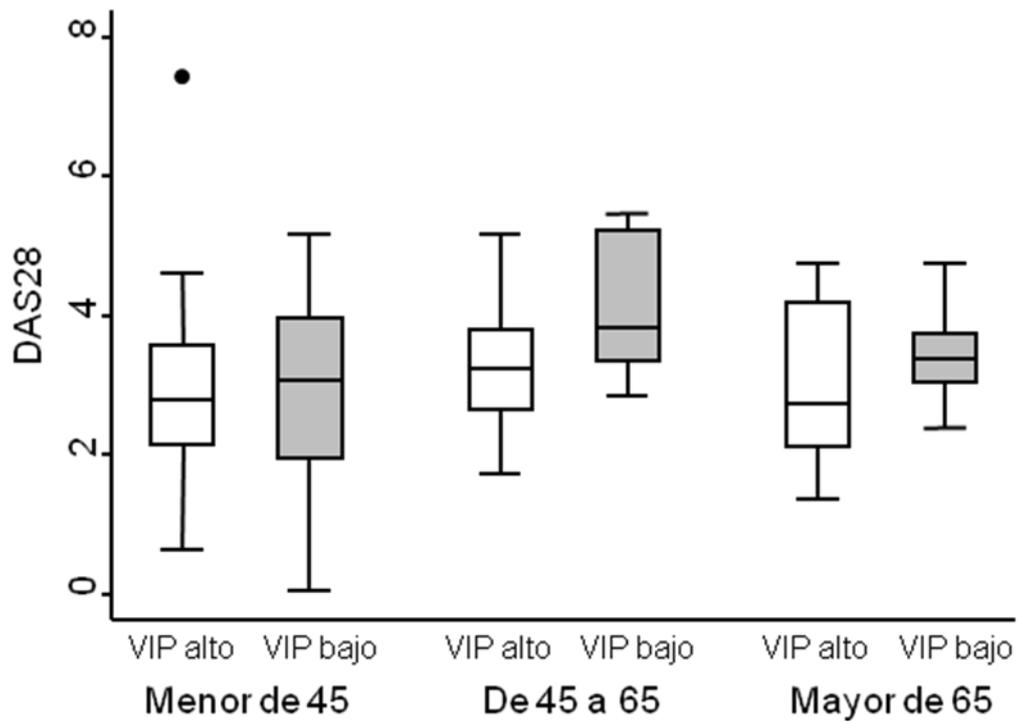


FIG. 6B

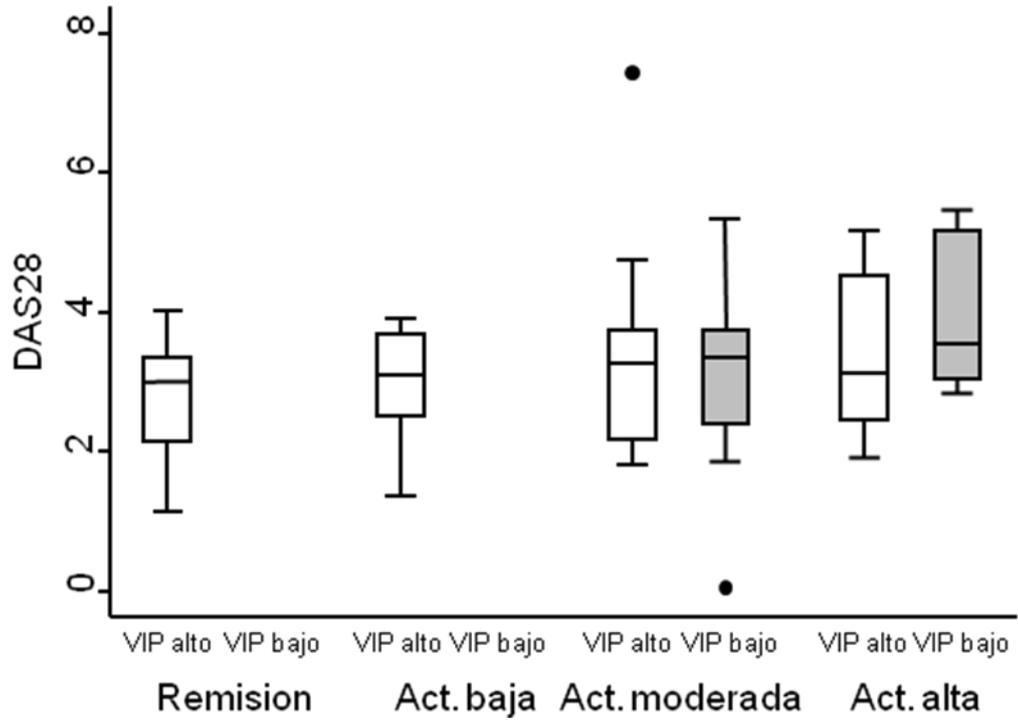


FIG. 6C

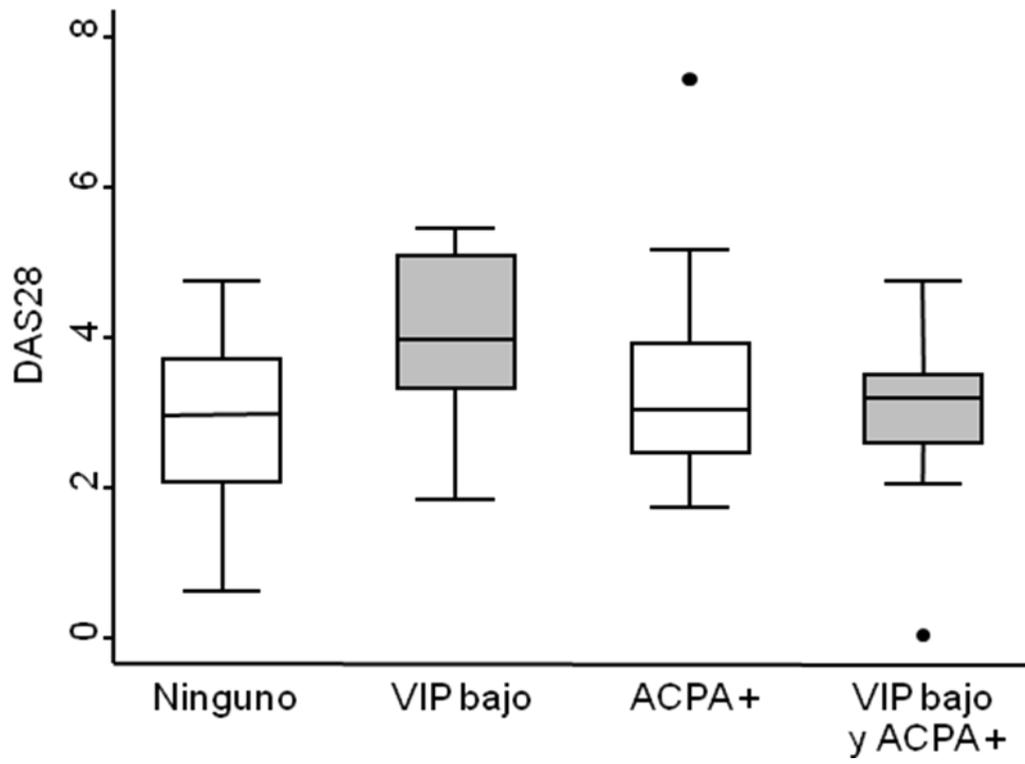


FIG. 7A

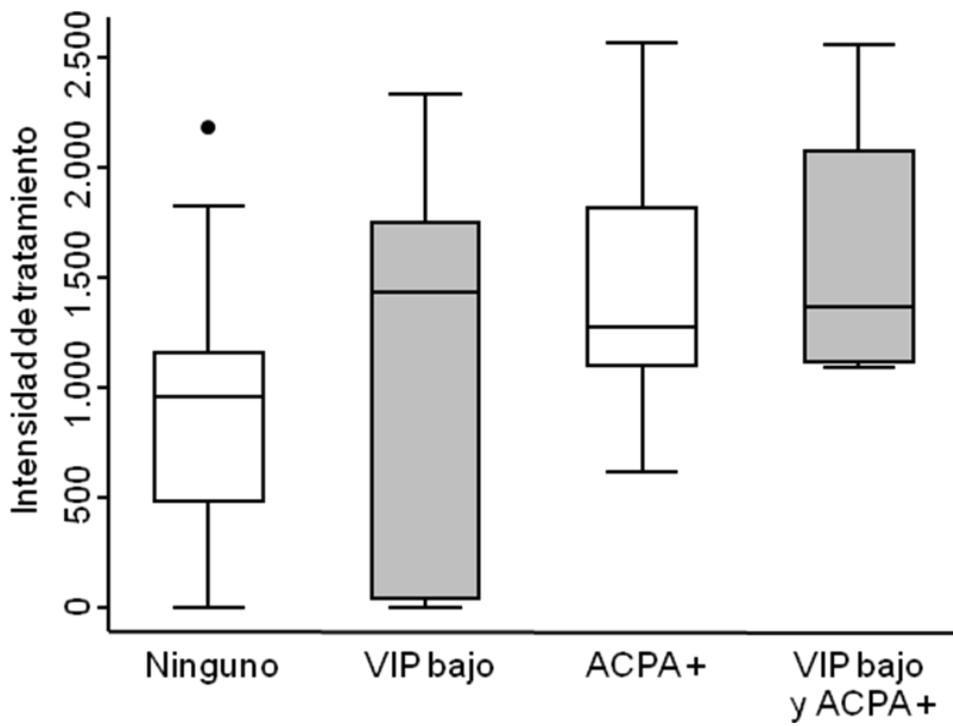


FIG. 7B

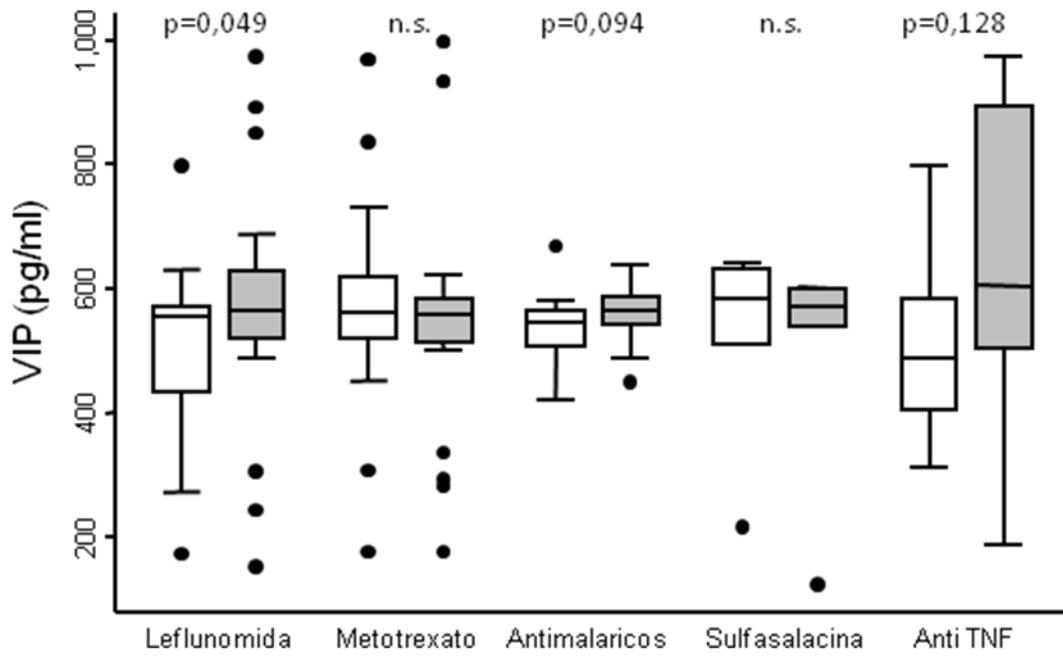


FIG. 8



- ②① N.º solicitud: 201230827
②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.05.2012
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K38/17** (2006.01)
A61P37/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HERNANZ A et al. Calcitonin gene-related peptide II, substance P and vasoactive intestinal peptide in plasma and synovial fluid from patients with inflammatory joint disease. British journal of rheumatology ENGLAND Enero 1993 01.1993 VOL: 32 No: 1 Págs: 31-35 ISSN 0263-7103 (Print) Doi: pubmed:7678534	1-14
X	ARNALICH F et al. Neuropeptides and interleukin-6 in human joint inflammation. Relationship between intraarticular substance P and interleukin-6 concentrations. NEUROSCIENCE LETTERS, 19940411 LIMERICK, IE 11.04.1994 VOL: 170 No: 2 Págs: 251-254 ISSN 0304-3940 Doi: doi:10.1016/0304-3940(94)90331-X	1-14
X	LARSSON J et al. Concentration of substance P, neurokinin A, calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide in synovial fluid from knee joints in patients suffering from rheumatoid arthritis. Scandinavian journal of rheumatology SWEDEN 1991 VOL: 20 No: 5 Págs: 326-335 ISSN 0300-9742 (Print) Doi: pubmed:1947895	1-14
X	LYGREN I et al. GASTROINTESTINAL PEPTIDES IN SERUM AND SYNOVIAL FLUID FROM PATIENTS WITH INFLAMMATORY JOINT DISEASE. Annals of the Rheumatic Diseases 1986 VOL: 45 No: 8 Págs: 637-640 ISSN 0003-4967.	1-14
X	BANGALE YOGESH et al. Vasoactive intestinal peptide binding autoantibodies in autoimmune humans and mice. Peptides (New York) Diciembre 2002 12.2002 VOL: 23 No: 12 Págs: 2251-2257 ISSN 0196-9781.	1-14

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
11.09.2013

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/5

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

A61P, A61K

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, EMBASE, BIOSIS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.09.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 4-12, 14	SI
	Reivindicaciones 1-3, 13	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-14	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	HERNANZ A et al. Calcitonin gene-related peptide II, substance P and vasoactive intestinal peptide in plasma and synovial fluid from patients with inflammatory joint disease. British journal of rheumatology ENGLAND Enero 1993 01.1993 VOL: 32 No: 1 Págs: 31-35 ISSN 0263-7103 (Print) Doi: pubmed:7678534	31.12.1992
D02	ARNALICH F et al. Neuropeptides and interleukin-6 in human joint inflammation. Relationship between intraarticular substance P and interleukin-6 concentrations. NEUROSCIENCE LETTERS, 19940411 LIMERICK, IE 11.04.1994 VOL: 170 No: 2 Págs: 251-254 ISSN 0304-3940 Doi: doi:10.1016/0304-3940(94)90331-X	11.04.1994
D03	LARSSON J et al. Concentration of substance P, neurokinin A, calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide in synovial fluid from knee joints in patients suffering from rheumatoid arthritis. Scandinavian journal of rheumatology SWEDEN 1991 VOL: 20 No: 5 Págs: 326-335 ISSN 0300-9742 (Print) Doi: pubmed:1947895	30.11.1990
D04	LYGREN I et al. GASTROINTESTINAL PEPTIDES IN SERUM AND SYNOVIAL FLUID FROM PATIENTS WITH INFLAMMATORY JOINT DISEASE. Annals of the Rheumatic Diseases 1986 VOL: 45 No: 8 Págs: 637-640 ISSN 0003-4967.	30.11.1985
D05	BANGALE YOGESH et al. Vasoactive intestinal peptide binding autoantibodies in autoimmune humans and mice. Peptides (New York) December 2002 12.2002 VOL: 23 No: 12 Págs: 2251-2257 ISSN 0196-9781.	30.11.2002

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 divulga el uso de los niveles de VIP como factor predictivo de la actividad de la enfermedad de artritis reumatoide en pacientes afectados con esta enfermedad.

Las reivindicaciones 1-3 hacen referencia al uso de VIP como marcador pronóstico de la artritis reumatoide

Las reivindicaciones 4-12 hacen referencia a un método in vitro para el pronóstico de la artritis reumatoide mediante la cuantificación del VIP en pacientes y grupo control, la comparación de ambos y el establecimiento de un punto de corte.

Las reivindicaciones 13, 14 se refieren al uso de un Kit para la detección del VIP.

D01 divulga un estudio con el fin de estudiar el potencial valor clínico de la cuantificación de neuropéptidos en líquido sinovial, poniendo especial atención en el estudio local y sistémico de las concentraciones de estos péptidos en diferentes formas de artritis. De forma particular se midieron los niveles de VIP (entre otros neuropéptidos, fig. 1) en pacientes con osteoartritis, gota y artritis reumatoide. Niveles significativamente más elevados de VIP en el líquido sinovial se encontraron en la artritis reumatoide en comparación con aquellos en la osteoartritis. Los niveles de VIP no mostraron diferencias significativas entre los pacientes de los tres grupos diferentes de artritis. Los resultados de este estudio sugieren que estos neuropéptidos liberados de las terminaciones nerviosas periféricas en la cavidad sinovial probablemente juegan un papel patogénico en la inflamación articular humana.

En D02 se divulga un estudio donde se analizaron las concentraciones de la calcitonina (CGRP), sustancia P y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) en plasma y líquido sinovial. Las concentraciones de IL-6 fueron elevadas en plasma y fluidos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide mientras que los niveles más altos de la sustancia P, CGRP-y VIP se encontraron en líquido sinovial, pero no en el plasma, de pacientes con reumatoide la artritis en comparación con los de la osteoartritis (ver fig.1).

En D03 se estudió la presencia de cinco neuropéptidos, entre ellos VIP, en líquido sinovial de rodilla en pacientes que sufrían de artritis reumatoide. Los datos muestran algunas diferencias cuantitativas entre los pacientes que sufrieron la artritis reumatoide con presencia de dolor, y los pacientes con articulaciones no inflamadas sin dolor; que indica una participación de fibras peptidérgicas en la artritis en los seres humanos.

En D04 se midieron los niveles de VIP en el suero y el líquido sinovial de pacientes afectados con enfermedad inflamatoria articular con el fin de comprobar la liberación de este péptido en las zonas de inflamación y su nivel de significación en la respuesta inflamatoria.

En D05 se analiza la presencia de anticuerpos anti VIP en varias enfermedades autoinmunes, entre ellas la artritis reumatoide concluyendo que la mayoría de los pacientes con historia de enfermedad autoinmune eran positivos para anti-VIP con alta afinidad para VIP.

D01-D03 divulgan métodos de detección inmunológicos de VIP con fines pronóstico-diagnóstico para la artritis reumatoide (AR), por lo que las reivindicaciones 1-3, 13 carecerían de novedad tal y como se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986. Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulga un método para establecer un valor predictivo de VIP en relación a la AR, por lo que las reivindicaciones 4-12, 14 cumplirían con el requisito de novedad tal y como se menciona en el art.6.

Tomando D01 como el documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la invención, la diferencia entre ambos sería la cuantificación de VIP. El efecto técnico de esta cuantificación sería poder establecer un valor de corte con valor predictivo para la artritis reumatoide. Por tanto, el problema técnico que plantea las reivindicaciones 1-14 sería la provisión de un método in vitro de cuantificación de VIP con valor predictivo para artritis reumatoide. Dado que D01 divulga que los resultados aportados por su estudio confirman que algunos neuropéptidos se liberan en las articulaciones de pacientes con artritis reumatoide y que existe un potencial valor diagnóstico en la cuantificación de estos péptidos en el líquido sinovial, que podría relacionarse incluso con el estado clínico inflamatorio del paciente, para el experto en la materia sería obvio elaborar un protocolo de cuantificación de VIP en pacientes con enfermedad AR frente a un grupo control y correlacionar estos datos con el estado clínico de esos pacientes, llegando a resultados positivos. Por tanto, las reivindicaciones 1-14 carecerían de actividad inventiva, tal y como se menciona en el art. 8 de la ley.