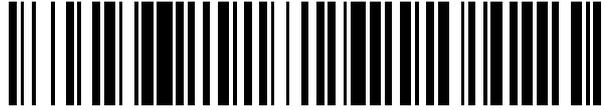


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 016**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2010 E 10708951 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013 EP 2399133**

54 Título: **GDF15 como un marcador diferencial para la espondiloartropatía**

30 Prioridad:

19.02.2009 GB 0902737

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

21.01.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT GENT (100.0%)
Sint-Pietersnieuwstraat 25
9000 Gent, BE**

72 Inventor/es:

**LAMBRECHT, STIJN;
DEFORCE, DIETER;
ELEWAUT, DIRK y
VERBRUGGEN, AUGUST**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 439 016 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

GDF15 como un marcador diferencial para la espondiloartropatía

5 **Antecedentes de la invención**

La superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) consiste en un número creciente de moléculas que regulan una diversidad de procesos celulares, tales como el crecimiento, la diferenciación y la oncogénesis. Los miembros de la superfamilia de TGF- β se han clasificado en agrupamientos principales de la familia, que incluyen TGF- β , proteínas morfogénicas (MP), proteínas morfogénicas óseas (BMP), proteínas osteogénicas (OP), factores de crecimiento y diferenciación (GDF), inhibinas/activinas, sustancias inhibidoras mullerianas (MIS) y factores neurotróficos derivados de células gliales (GDNF). TGF- β se caracterizó primero por su efecto sobre la proliferación celular. Estimuló el crecimiento independiente del anclaje de fibroblastos de riñón de rata e inhibió el crecimiento de células de riñón de mono. Se ha demostrado que los miembros de la familia de TGF- β tienen muchos efectos biológicos diversos, p.ej. regulan la formación del hueso, inducen en las células musculares de rata la producción de macromoléculas específicas del cartílago, inhiben el crecimiento de células progenitoras hematopoyéticas tempranas, células T, células B, queratinocitos de ratón, y varias líneas celulares de cáncer humano. Los miembros de la familia de TGF- β incrementan la síntesis y secreción de colágeno y fibronectina, aceleran la cicatrización de heridas quirúrgicas, inhiben la síntesis de caseína en explantes mamarios de ratón, inhiben la síntesis de ADN en células epiteliales hepáticas de rata, estimulan la producción de proteoglicanos de unión a bFGF, modulan la fosforilación del receptor de factor de crecimiento epidérmico ("EGF") y la proliferación de células de carcinoma epidermoide, y pueden conducir a la apoptosis en las células epiteliales uterinas, hepatocitos cultivados e hígado en regresión. Los TGF- β s pueden mediar en la cardio-protección contra la lesión por reperfusión inhibiendo la adherencia de los neutrófilos al endotelio, y pueden proteger contra las enfermedades autoinmunitarias experimentales en ratones. En general, las proteínas de la familia de TGF- β son factores de crecimiento multifuncionales, activos, y también tienen actividades biológicas relacionadas tales como la atracción quimiotáctica de células, la estimulación de la diferenciación celular y la capacidad inductora de tejido. Las diferencias en su estructura y su afinidad hacia los receptores conducen a variaciones considerables en su función biológica exacta.

Las proteínas de la familia de TGF- β se sintetizan en forma de proteínas precursoras inactivas grandes (formas de pro-proteína), que se procesan de manera proteolítica en un sitio dibásico (RXXR) para generar la forma madura activa de la proteína.

El factor de diferenciación del crecimiento 15 es un miembro lejano de la familia de TGF- β . La expresión de la forma madura de la proteína factor de diferenciación del crecimiento 15 (GDF15) está asociada a la carcinogénesis prostática temprana. GDF15 se ha descrito en la bibliografía como la citocina inhibidora de macrófagos 1 (MIC-1), proteína morfogénica ósea placentaria (PLAB), factor de crecimiento transformante placentario β (PTGF- β), factor derivado de próstata (PDF), y gen activado anti-inflamatorio no esteroideo 1 (NAG-1), lo que refleja las diferentes funciones en las que se ha implicado a esta proteína.

El documento WO2001081928 publicado el 1 de noviembre de 2001 describe ensayos de diagnóstico y métodos de tratamiento que implican GDF15, y el documento WO1999006445 publicado el 11 de febrero de 1999 describe la secuencia polinucleotídica de GDF15 y la secuencia de aminoácidos. Mc-Gonagle, D. et al, (Lancet (1998), Vol. 352, n°. 9134: 1137-1140) describe un método para diferenciar la espondiloartropatía de la artritis reumatoide mediante el uso de MRI con supresión de grasas.

En estudios anteriores sobre la expresión de GDF15 en células humanas normales y de cáncer de próstata, se descubrió que el nivel del transcrito de GDF15 no se correlaciona necesariamente bien con el de la proteína GDF15 (Noorali et al. Differentiation (2007) 75: 325-336). Las razones para estas discrepancias se podrían deber a diferencias en las modificaciones postranscripcionales o del procesamiento del ARN, que influye en su estabilidad o traducción, o modificaciones postraduccionales de la proteína que afectan a la maduración, acumulación o degradación de la proteína.

Como se indicó anteriormente, GDF-15 puede tener aplicaciones en el tratamiento de trastornos inmunológicos. En particular, GDF-15 se puede usar como un agente anti-inflamatorio o como un tratamiento para trastornos relacionados con la proliferación o función anormal de los linfocitos.

Muchas formas de enfermedades reumáticas inflamatorias son trastornos autoinmunitarios, en los que el organismo considera a sus propios tejidos como extraños, y reacciona con la inflamación. Estas afecciones autoinmunitarias incluyen la artritis reumatoide y la espondiloartropatía.

La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad autoinmunitaria que provoca inflamación crónica de las articulaciones, el tejido que rodea a las articulaciones, así como otros órganos del cuerpo. Los pacientes con estas enfermedades tienen anticuerpos en su sangre que seleccionan como objetivo a sus propios tejidos corporales que pueden estar asociados a la inflamación. Debido a que puede afectar a otros diversos órganos del cuerpo, se hace referencia a la artritis reumatoide como una enfermedad sistémica, y a veces se denomina enfermedad reumatoide. Aunque la

artritis reumatoide es una enfermedad crónica (lo que significa que puede durar años), los pacientes pueden experimentar períodos largos sin síntomas.

5 Brown et al. (Arthritis & Rheumatism (2007) 56: 753-764) demostró que los niveles séricos de GDF15 aumentaron en la artritis reumatoide, y reflejaron la gravedad de la enfermedad independientemente de los marcadores clásicos de la enfermedad. La variación de los niveles séricos de GDF15 con la gravedad de la enfermedad, la reducción de los niveles con un tratamiento eficaz, la asociación de las variaciones alélicas con la enfermedad erosiva y la RA resistente al tratamiento, y la expresión local de GDF15 en el líquido sinovial reumatoide apoyan claramente la noción de un papel para esta citocina en la patogénesis de RA.

10 La espondiloartropatía (SpA) es el nombre dado a un grupo de enfermedades crónicas o de larga duración también denominadas espondiloartritis o espondilitis. Estas enfermedades son formas de artritis inflamatoria que afectan principalmente a la columna vertebral, aunque se pueden ver implicadas otras articulaciones y órganos. Hasta ahora no se han desarrollado ensayos de laboratorio que sean específicos para la espondilitis anquilosante.

15 La osteoartritis (OA) es una enfermedad degenerativa compleja, multifactorial, dependiente de la edad, de las articulaciones sinoviales. Afecta a las mujeres en una proporción mayor que a los hombres, en particular después de la menopausia. OA se caracteriza por cambios en todos los componentes de la articulación, y la degeneración y pérdida de cartílago articular y los cambios en el hueso subcondral son factores constantes en la progresión de la enfermedad. Junto con la degradación del cartílago y el estrechamiento del espacio de la articulación, se da un engrosamiento y esclerosis del hueso subcondral, el desarrollo de quistes y excrescencias óseas en los bordes de la articulación. A pesar de un incremento de la fracción de volumen óseo, el hueso subcondral es más débil mecánicamente en OA debido a la hipomineralización, el metabolismo incrementado del colágeno y una remodelación ósea alterada.

25 En un informe de Hopwood et al. (Arthritis Research & Therapy (2007) 9: R100), la identificación de la expresión genética en micromatrices del hueso osteoartrotico sugiere una señalización TGF-β/BMP alterada. La expresión génica de GDF15 estuvo inhibida en OA en comparación con el hueso de control.

30 Un informe reciente de Iliopoulos et al (PLoS ONE (2008) 3:e3740) describe que GDF15 es una proteína expresada de manera diferencial entre los condrocitos osteoartroticos y los normales.

35 Las enfermedades reumáticas inflamatorias diferenciadas, tales como RA y SpA, se caracterizan por defectos del cartílago articular e inflamación persistente de las articulaciones que pueden conducir a dolor crónico grave, malestar y discapacidad funcional. Especialmente en las fases tempranas de la enfermedad, a menudo es difícil cumplir los criterios de diagnóstico o clasificación de ninguna de estas enfermedades, y por lo tanto se usa la expresión artritis indiferenciada. Cuando la enfermedad solamente se ha manifestado clínicamente durante un período corto de tiempo, se usa la expresión artritis temprana. A los pacientes a los que no se les puede clasificar en una artropatía bien definida que ha aparecido solamente en un período de tiempo corto se les atribuye en general una artritis indiferenciada temprana. A lo largo del tiempo, ciertos pacientes desarrollan características suficientes para permitir la clasificación, mientras otros permanecen indiferenciados.

40 Por lo tanto, existe una necesidad particular de un marcador que permita un diagnóstico diferencial temprano y sencillo de SpA de otras enfermedades reumáticas inflamatorias, o de RA dentro del grupo de enfermedades reumáticas inflamatorias o para identificar el subgrupo de pacientes que tienen artritis indiferenciada temprana destinados a desarrollar RA o SpA. Esto es importante para la elección de las estrategias adecuadas de tratamiento, para evitar la destrucción irreversible (adicional) de la articulación y la pérdida de función y para proporcionar una buena calidad de vida.

45 El problema anterior se resuelve mediante la presente invención. GDF15 es una proteína secretada, lo que hace fácil medirla en muestras biológicas sin necesidad de recoger las células.

Sumario de la invención

55 La invención proporciona el uso de GDF15 como marcador in vitro para diferenciar la espondiloartropatía (SpA) de otras enfermedades reumáticas inflamatorias, tales como, por ejemplo, artritis reumatoide (RA) o para predecir el desarrollo de SpA o RA desde la artritis indiferenciada. Más en particular, la invención proporciona el uso de GDF15 como un marcador in vitro para diferenciar SpA de RA, o para predecir el desarrollo de SpA a partir de la artritis indiferenciada. La presente invención también proporciona el uso anteriormente descrito de GDF15 en un panel de marcadores.

60 En una realización, la presente invención proporciona un método in vitro para diferenciar SpA de RA o para diferenciar SpA o RA de la artritis indiferenciada, y dicho método comprende determinar la cantidad del marcador molecular GDF15 presente en una muestra biológica y correlacionar dicha cantidad determinada con la presencia o el desarrollo de SpA. Además, dicho método puede comprender además comparar dicha cantidad determinada respecto del intervalo de cantidades de GDF15 presente en las muestras biológicas normales o de referencia. La

muestra biológica puede ser una muestra de suero sanguíneo y/o una muestra de líquido sinovial. La cantidad de GDF15 presente en la muestra biológica se puede determinar mediante un inmunoensayo con el uso de anticuerpos o fragmentos de los mismos hacia GDF15.

- 5 En un aspecto de la invención, la determinación de GDF15 se combina con la detección de uno o más marcadores de enfermedades reumáticas inflamatorias. Dichos uno o más marcadores de enfermedades reumáticas inflamatorias pueden ser, por ejemplo, un factor reumatoide o/y un anticuerpo hacia péptidos citrulinados.

Breve descripción de los dibujos

10 Figura 1 A y B: Concentración de GDF15 en muestras de suero sanguíneo de pacientes diagnosticados con RA, SpA y OA, respectivamente.

15 Figura 2 A y B: Concentración de GDF15 en muestras de líquido sinovial de pacientes diagnosticados con RA, SpA y OA, respectivamente.

Figura 3 A y B: proporciones de concentraciones de GDF 15 (muestra de suero / líquido sinovial)

20 Figura 4: Análisis de la curva ROC para GDF15 en muestras de suero y líquido sinovial de SpA frente a RA

Figura 5: Estudio del valor del marcador GDF15 y anti-CCP como un marcador adicional bien conocido para la probabilidad de distinguir los pacientes de RA y SpA basándose en diferentes valores de corte de la concentración de GDF15 y la presencia/ausencia de una señal de CCP.

25 Descripción detallada

Las espondiloartropatías (SpAs) son una familia de trastornos relacionados que incluyen, pero sin limitación, espondilitis anquilosante (EA), artritis reactiva (ReA; también conocida como síndrome de Reiter [SR]), artritis psoriásica (APs), espondiloartropatía asociada a la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), espondiloartropatía indiferenciada (USpA), y, posiblemente, enfermedad de Whipple y enfermedad de Behçet. La espondilitis anquilosante, que literalmente significa "columna vertebral inflamada que se fusiona", es la espondiloartropatía prototípica.

35 Las enfermedades reumáticas inflamatorias diferenciadas, tales como RA y SpA, se caracterizan por defectos del cartílago articular e inflamación persistente de las articulaciones que pueden conducir a dolor crónico grave, malestar y discapacidad funcional. A los pacientes a los que no se les puede clasificar en una artropatía bien definida con un inicio reciente se les atribuye en general una artritis indiferenciada temprana o artritis temprana. Ciertos pacientes desarrollan características suficientes para permitir la clasificación, mientras otros permanecen indiferenciados.

40 En una realización, la presente invención proporciona el uso de GDF15 como un marcador in vitro para diferenciar la espondiloartropatía (SpA) de otras enfermedades reumáticas inflamatorias, tales como, por ejemplo, artritis reumatoide (RA), o para predecir el desarrollo de SpA o RA a partir de la artritis indiferenciada, más en particular como un marcador in vitro para diferenciar o predecir el desarrollo de SpA a partir de la artritis indiferenciada.

45 La expresión "una muestra biológica" incluye, pero sin limitación, suero, sangre, líquido sinovial, saliva, esputo, orina, materia fecal o tejido. Los métodos para obtener muestras biológicas de sujetos se conocen en la técnica, y no se describen con detalle en la presente memoria.

50 Tal como se usa en la presente memoria, el polipéptido "GDF 15" significa una proteína codificada por un gen *gdf15* de mamífero (otros nombres son los genes *mic1*, *plab*, *ptgf-B*, *pdf* o *nag-1*), que incluye las variantes alélicas así como los fragmentos biológicamente activos de los mismos que contienen cambios conservativos o no conservativos así como las proteínas artificiales que son sustancialmente idénticas, es decir, un 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idénticas a cualquiera de los polipéptidos GDF15 anteriormente mencionados. En una realización particular, el polipéptido GDF15 es un 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico al GDF15 humano (codificado por el número de acceso de Genbank NM_004864 (mARN) o NC_000019.8 (genómico)). Dentro del significado de esta expresión, GDF 15 abarca todas las proteínas codificadas por un gen *gdf15*, los mutantes de las mismas, las proteínas de corte y empalme alternativo de las mismas, los fragmentos de las mismas y las proteínas glicosiladas de las mismas, y otras modificaciones postraduccionales de las mismas.

60 Análogamente, el polinucleótido de "GDF15" pretende incluir las variantes alélicas así como los fragmentos biológicamente activos del mismo que contienen cambios conservativos o no conservativos, así como cualquier molécula de ácido nucleico que sea sustancialmente idéntica, es decir, un 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a cualquiera de los polinucleótidos que codifican GDF15 anteriormente mencionados. En una realización particular, el polinucleótido de GDF15 es un 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a la molécula de ácido nucleico que codifica

GDF15 humano (número de acceso de Genbank NM_004864 (mARN) o NC_000019.8 (genómico)).

Tal como se usan en la presente memoria, los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan de manera intercambiable para referirse a polinucleótidos de cualquier longitud, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos (p.ej., inosina, 7-desazaguanosina, etc.) de los mismos. "Oligonucleótidos" se refiere a polinucleótidos de menos de 100 nucleótidos de longitud, preferiblemente menos de 50 nucleótidos de longitud, y lo más preferiblemente alrededor de 10-30 nucleótidos de longitud. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional, y pueden llevar a cabo cualquier función, conocida o desconocida. Lo siguiente son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: un gen o fragmento génico (por ejemplo, una sonda, cebador, etiqueta EST o SAGE), exones, intrones, ARN mensajero (mARN), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, cADN, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Un polinucleótido puede incluir nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si están presentes, las modificaciones de la estructura de los nucleótidos se pueden conferir antes o después del montaje del polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir mediante componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente tras la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente marcador. El término también se refiere a moléculas tanto bicatenarias como monocatenarias. A menos que se especifique o sea necesario de otra manera, cualquier realización de esta invención que sea un polinucleótido abarca tanto la forma bicatenaria como cada una de las dos formas monocatenarias complementarias que se conocen o que se predice que constituyen la forma bicatenaria.

"Polipéptido" se refiere a cualquier péptido o proteína que comprende aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados. "Polipéptido" se refiere tanto a cadenas cortas, habitualmente denominadas péptidos, oligopéptidos u oligómeros, como a cadenas más largas, en general denominadas proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados genéticamente.

Los "polipéptidos" incluyen las secuencias de aminoácidos modificadas mediante procesos naturales, tales como procesamiento postraduccion, o mediante métodos de modificación química que se conocen bien en la técnica. Tales modificaciones se describen en libros de texto básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa bibliografía de investigación.

Las modificaciones se pueden dar en cualquier parte de un polipéptido, que incluye el esqueleto peptídico, las cadenas laterales de los aminoácidos y los extremos amino o carboxilo. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o en grados variables en varios sitios en un polipéptido dado. Además, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones (véase, por ejemplo, *Protein-Structure and Molecular Properties*, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York, 1993; Wold, F., *Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects*, págs. 1-12 en *Postranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, 1983; Seifter et al., "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", *Meth Enzymol* (1990) 182: 626-646 y Rattan et al., "Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging", *Ann NY Acad Sci* (1992) 663: 4842).

"Marcador diferencial" o "marcador" significa un polipéptido y las modificaciones del mismo que distingue un grupo de sujetos o muestras de otro grupo de sujetos o muestras.

La invención también se refiere a un método in vitro para diferenciar SpA de RA o de la artritis indiferenciada, y dicho método comprende determinar la cantidad del GDF15 presente en una muestra biológica y correlacionar dicha cantidad determinada con la presencia o el desarrollo de SpA. En este método, la cantidad determinada se puede comparar de manera diferencial con el intervalo de cantidades de GDF15 presentes en las muestras biológicas de sujetos que tienen osteoartritis, artritis reumatoide o enfermedades reumáticas inflamatorias. Así, la cantidad de GDF15 presente en una muestra biológica de un paciente se puede comparar con las muestras biológicas normales o de referencia. Por ejemplo, cuando se determina la cantidad de GDF15 de un paciente en una muestra de suero se puede comparar con la cantidad de GDF15 en muestras de suero de sujetos sanos (muestras normales). En otro ejemplo, la cantidad de GDF15 en una muestra de líquido sinovial de un sujeto que se sospecha que tiene espondiloartropatía se puede comparar con las muestras de sujetos que no tienen una enfermedad reumática inflamatoria, tales como sujetos sanos o sujetos con OA (muestras de referencia).

Por lo tanto, en una realización de la invención, el método tal como se describió anteriormente comprende además comparar dicha cantidad determinada con el intervalo de cantidades de GDF15 presentes en las muestras biológicas normales o de referencia.

Como apreciará el técnico experto, la diferenciación entre SpA y RA o entre SpA y la artritis indiferenciada se hace in vitro. Por lo tanto, la muestra del paciente se usa simplemente para el método in vitro de la invención. La cantidad de GDF15 se puede determinar en más de una muestra biológica. Más en particular, la cantidad de GDF15 se puede determinar en una, dos o más muestras del mismo sujeto de ensayo. En general, la muestra es una muestra líquida. Preferiblemente, la muestra biológica es una muestra de suero sanguíneo o una muestra de líquido sinovial.

La cantidad de GDF15 presente en la una, dos o más muestras biológicas o la proporción de la cantidad de GDF15 presente en una primera y una segunda muestra biológica se pueden correlacionar con la presencia o el desarrollo de espondiloartropatía.

5 La primera y segunda muestras biológicas pueden ser del mismo líquido o tejido, p.ej. pueden ser ambas muestras de suero o muestras de líquido sinovial, o pueden ser de líquidos y tejidos diferentes, p.ej. pueden ser una muestra de suero y una muestra de líquido sinovial.

Las muestras biológicas se pueden tomar en el mismo momento o en momentos diferentes.

10 Como apreciará el técnico experto, la etapa de correlacionar un nivel de GDF15 particular con la presencia o el desarrollo de SpA se puede llevar a cabo y conseguir de maneras diferentes. En general, en cada una de dichas metodologías (ensayos) se selecciona una población de referencia y se establece un intervalo de referencia. Este intervalo de referencia, en términos de valores absolutos, como una concentración dada, depende por lo tanto del
15 ensayo empleado y de la estandarización usada para producir el ensayo.

El contexto ideal para el diagnóstico sería una situación en la que la existencia o presencia de un único suceso (parámetro) o proceso se correlacionaría con la enfermedad respectiva. En todos los demás casos, el diagnóstico
20 correcto puede ser muy difícil, especialmente cuando la etiología de la enfermedad no se entiende completamente, como es el caso para SpA.

En dichas circunstancias, la exactitud del método de diagnóstico usado, es decir, el ensayo con su nivel de marcador GDF15 particular, se describe mejor mediante sus características operativas del receptor (ROC). El gráfico ROC es una representación gráfica de todos los pares sensibilidad/especificidad que son el resultado de variar
25 continuamente el umbral de decisión a lo largo del todo el intervalo de datos observados.

El rendimiento clínico de un ensayo de laboratorio depende de su exactitud de diagnóstico, o la capacidad de clasificar correctamente a los sujetos en subgrupos clínicamente relevantes. La exactitud del diagnóstico mide la capacidad del ensayo de distinguir correctamente dos condiciones diferentes de los sujetos investigados. Tales
30 condiciones son, por ejemplo, salud y enfermedad o enfermedad frente a otra enfermedad, como en el caso presente.

En cada caso, la representación gráfica ROC representa la superposición parcial entre las dos distribuciones representando gráficamente la sensibilidad frente a 1-especificidad para todo el intervalo de umbrales de decisión. En el eje Y la sensibilidad, o la fracción verdadera positiva se define como (número de resultados del ensayo verdaderos positivos)/ (número de resultados del ensayo verdaderos positivos + número de falsos negativos). Esto también se ha denominado positividad en presencia de una enfermedad o afección específica. Se calcula únicamente a partir del subgrupo afectado o el subgrupo que tiene una enfermedad específica (p.ej. SpA). En el eje X la fracción falsa positiva, o 1-especificidad se define como (número de resultados falsos positivos)/ (número de resultados verdaderos negativos + número de falsos positivos). Es un índice de la especificidad, y se calcula completamente a partir del subgrupo no afectado o del subgrupo que tiene otra enfermedad específica (p.ej.,
40 muestras de pacientes de RA).

Debido a que las fracciones verdaderas y falsas positivas se calculan completamente por separado, mediante el uso de los resultados de los ensayos de dos subgrupos diferentes, la representación gráfica ROC es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto de la representación gráfica ROC representa un par sensibilidad/1-especificidad que corresponde a un umbral de decisión particular (p.ej. una concentración de corte de GDF 15). Un ensayo con una discriminación perfecta (sin superposición parcial en las dos distribuciones de resultados) tiene una representación gráfica ROC que pasa a través de la esquina superior izquierda, en la que la fracción verdadera positiva es 1,0, o 100% (sensibilidad perfecta), y la fracción falsa positiva es 0 (especificidad perfecta). La representación gráfica teórica para un ensayo sin discriminación (distribuciones idénticas de resultados para los dos grupos) es una línea diagonal de 45° desde la esquina inferior izquierda hasta la esquina superior derecha. La mayoría de las representaciones gráficas se hallan entre estos dos extremos. (Si la representación gráfica ROC se halla completamente por debajo de la diagonal de 45°, esto se remedia fácilmente invirtiendo el criterio para "positividad" de "mayor de" a "menor de" o viceversa). De manera cualitativa, cuanto más cercana esté la representación gráfica a la esquina superior izquierda, mayor será la exactitud total del ensayo.
55

Un objetivo adecuado para cuantificar la exactitud de diagnóstico de un ensayo de laboratorio es expresar su rendimiento mediante un simple número. La medida global más habitual es el área bajo la representación gráfica ROC. Por convenio, este área es siempre $> 0,5$ (si no, se puede invertir la regla de decisión para conseguirlo). Los valores oscilan entre 1,0 (separación perfecta de los valores de ensayo de los dos grupos) y 0,5 (no hay diferencia de distribución aparente entre los dos grupos de valores de ensayo). El área no depende solamente de una porción particular de la representación gráfica, tal como el punto más cercano a la diagonal o la sensibilidad a un 90% de especificidad, sino de la representación gráfica completa. Esta es una expresión cuantitativa y descriptiva de lo cerca
60 que la representación gráfica ROC está de la perfecta (área = 1,0).
65

Un marcador se califica como un marcador diferencial para SpA si el área bajo la curva (ABC) para este marcador solo, cuando se determina la exactitud de diagnóstico comparando muestras de pacientes con SpA frente a muestras de pacientes con RA, es al menos 0,65.

5 Se describió previamente que los niveles de GDF15 están elevados en el suero de pacientes con la artropatía inflamatoria, RA. Inesperadamente, los niveles en suero sanguíneo de GDF15 son bajos en SpA aunque las proporciones de concentraciones de GDF15 (suero / líquido sinovial) en los pacientes de SpA son elevadas en comparación con RA.

10 La cantidad de GDF 15 presente en una muestra biológica se puede determinar fácilmente mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, inmunoensayos con el uso de anticuerpos (monoclonales o policlonales) o fragmentos de los mismos hacia GDF15. Los anticuerpos anti-GDF15 y los fragmentos de los mismos se pueden producir mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica.

15 Los anticuerpos se pueden unir a muchos portadores diferentes, y se pueden usar para detectar la presencia de un antígeno de GDF15. La naturaleza del portador puede ser soluble o insoluble. Los ejemplos de portadores conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, agarosas y microesferas magnéticas. Los expertos en la técnica conocerán otros portadores adecuados para los anticuerpos de unión, o podrán determinarlos, mediante el uso de la experimentación rutinaria.

20 Además, los anticuerpos en estos inmunoensayos pueden estar marcados de forma detectable de diversas maneras. Los ejemplos de tipos de inmunoensayos que pueden utilizar anticuerpos son los inmunoensayos competitivos y no competitivos en un formato directo o indirecto. Los ejemplos de tales inmunoensayos son el radioinmunoensayo (RIA) y el ensayo de tipo sándwich (inmunométrico).

25 Existen muchos marcadores diferentes y métodos de marcaje conocidos para las personas de experiencia habitual en la técnica. Los ejemplos de los tipos de marcadores, que se pueden usar en la presente invención, incluyen enzimas, radioisótopos, compuestos fluorescentes, metales coloidales, compuestos quimioluminiscentes, compuestos fosforescentes, y compuestos bioluminiscentes. Las personas de experiencia habitual en la técnica conocerán otros marcadores adecuados para la unión a un anticuerpo, o serán capaces de determinarlos, mediante el uso de la experimentación rutinaria.

35 Otra técnica, que también puede dar como resultado una sensibilidad mayor, consiste en acoplar los anticuerpos a haptenos de peso molecular bajo. Estos haptenos se pueden detectar después de manera específica por medio de una segunda reacción. Por ejemplo, es habitual usar haptenos tales como biotina, que reacciona con avidina, o dinitrofenilo, piridoxal, y fluoresceína, que pueden reaccionar con anticuerpos antihapteno específicos.

40 Por lo tanto, en un método de la invención, se puede determinar la cantidad de GDF15 presente en la muestra biológica mediante un inmunoensayo mediante el uso de anticuerpos o fragmentos de los mismos hacia GDF15.

45 En general, se consideran juntos diversos síntomas clínicos y marcadores biológicos para el diagnóstico. Los marcadores se pueden determinar individualmente o se pueden medir simultáneamente. Las concentraciones de los biomarcadores se interpretan después independientemente mediante el uso de un valor de corte individual para cada marcador, o se combinan para la interpretación.

50 Con frecuencia, se estudia la combinación de marcadores. Preferiblemente, se combinan matemáticamente los valores medidos para los marcadores de un panel de marcadores, y el valor combinado se correlaciona con la cuestión de diagnóstico subyacente. Los valores de los marcadores se pueden combinar mediante cualquier método matemático adecuado del estado de la técnica.

55 Una realización preferida de la invención es usar un valor de corte multivariante optimizado para la combinación subyacente de marcadores biológicos y discriminar el estado A del estado B. En este tipo de análisis los marcadores ya no son independientes, sino que forman un panel de marcadores.

60 Los factores reumatoides (=RF) son autoanticuerpos dirigidos hacia la región Fc constante de la inmunoglobulina G. Se halla en enfermedades reumáticas inflamatorias tales como RA y SpA, enfermedades que no son reumáticas e incluso en personas sanas de edades superiores a los 60 años. Los autoanticuerpos RF pertenecen a todas las clases de inmunoglobulinas, y la mayoría de los ensayos usados actualmente no diferencian entre los isotipos IgM, IgG e IgA. Más recientemente, la atención se ha centrado en los isotipos de RF IgG e IgA.

65 El marcador diferencial GDF15 se puede usar en combinación con marcadores de artritis inflamatoria tales como, pero sin limitación, los isotipos de factores reumatoides (RF) (p.ej. RF-IgM y RF-IgA) y/o anticuerpos hacia péptidos citrulinados. Estos últimos incluyen, pero sin limitación, los anticuerpos hacia el factor antiperinuclear (APF) y los anticuerpos hacia queratina (AKA), en particular aquellos que seleccionan como objetivo filagrina. El uno o más marcadores como se indicaron anteriormente se pueden combinar con cualquier marcador conocido o futuro de SpA.

Por lo tanto, en una realización de la invención, la determinación de GDF 15 se combina con la determinación de uno o más marcadores de enfermedades reumáticas inflamatorias. Las enfermedades reumáticas inflamatorias forman un grupo de trastornos que son sumamente variables en su expresión fenotípica. Sin embargo, tienen en común la presencia de inflamación localizada y/o sistémica, lo que da como resultado una lesión característica del tejido conectivo y de los órganos internos. En particular, el uno o más marcadores para la enfermedad reumática inflamatoria se seleccionan del grupo que consiste en un factor reumatoide y un anticuerpo hacia los péptidos citrulinados.

Así, la presente invención también proporciona el uso de GDF15 como un marcador in vitro para diferenciar SpA de RA o para predecir el desarrollo de SpA o RA a partir de la artritis indiferenciada, en un panel de marcadores.

Los agentes descritos en la presente memoria se pueden envasar en forma de un equipo. Así, puede haber presentes uno o más agentes en un primer recipiente, y el equipo puede incluir opcionalmente uno o más agentes en un segundo recipiente. El equipo puede incluir instrucciones que describen el método de la presente invención. Los agentes, recipientes y/o las instrucciones pueden estar presentes en un envase.

El contenido del equipo puede contener, pero sin limitación, tampones o sus constituyentes, anticuerpos, placas multipocillo, sustratos de enzimas, agentes bloqueantes, marcadores de referencia, etc.

Esta invención se entenderá mejor mediante referencia a los detalles experimentales siguientes, pero los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que éstos son solamente ilustrativos de la invención tal como se describe más completamente en las reivindicaciones que siguen a continuación. Además, a lo largo de esta solicitud, se citan diversas publicaciones.

Parte experimental

Ejemplo 1. Análisis de la concentración de GDF15 en muestras de suero sanguíneo

Se obtuvieron muestras de suero de 121 pacientes. En este estudio se incluyeron 38 pacientes con RA que cumplían los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR) (Arnett, F. C., Edworthy, S. M., Bloch, D. A., McShane, D. J., et al., *Arthritis Rheum.* 1988, 31, 315-24), 67 pacientes con SpA que cumplían los criterios del Grupo Europeo para el Estudio de las Espondiloartropatías (Dougados, M., van-der-Linden, S., Juhlin, R., Huitfeldt, B., et al., *Arthritis Rheum.* 1991, 34, 218-27) y 16 pacientes con osteoartritis (OA) que cumplían los criterios del ACR (Altman, R., Asch, E., Bloch, D., Bole, G., et al., *Arthritis Rheum.* 1986, 29, 1039-49). Después del aislamiento del suero, las muestras se congelaron inmediatamente hasta su uso posterior. Se midieron las concentraciones de GDF 15 mediante las técnicas de ELISA habituales con el uso del ELISA de GDF15 DuoSet (R&D Systems, Abingdon, R.U.) según las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 2. Análisis de la concentración de GDF15 en muestras de líquido sinovial

Se obtuvieron muestras de líquido sinovial de 115 pacientes que se sometieron a artroscopia con aguja de la rodilla para el seguimiento del diagnóstico o por razones terapéuticas. Se incluyeron en este estudio 39 pacientes con RA que cumplían los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR), 68 pacientes con SpA que cumplían los criterios del Grupo Europeo para el Estudio de las Espondiloartropatías y 8 pacientes con osteoartritis (OA) que cumplían los criterios del ACR. Todos los pacientes que se sometieron a artroscopia con aguja tenían sinovitis activa (RA y SpA) o derrame articular (OA) de la rodilla. Las muestras se congelaron inmediatamente hasta su uso posterior. Se midieron las concentraciones de GDF15 mediante las técnicas de ELISA habituales con el uso del ELISA de GDF15 DuoSet (R&D Systems, Abingdon, R.U.) según las instrucciones del fabricante.

Resultados de los ejemplos 1 y 2

Se analizaron las concentraciones de GDF15 en muestras de suero de pacientes de RA, OA y SpA. Como se podría esperar, se hallaron niveles significativamente incrementados ($p < 0,0001$) en los pacientes de RA (993,7 pg/ml \pm 81,7) (figura 1A y B). Los niveles de GDF15 en SpA (508,21 pg/ml \pm 64,7) fueron similares a los niveles de los controles sanos (442,1 pg/ml \pm 39,0, $n=3$). Los pacientes de OA mostraron niveles ligeramente elevados (638,9 pg/ml \pm 78,22).

Las concentraciones de GDF15 en las muestras de líquido sinovial de pacientes de RA (1094,35 pg/ml \pm 92,87), SpA (815,3 pg/ml \pm 89,26) y OA (967,7 pg/ml \pm 186,0) siguen la misma tendencia ($p = 0,0019$) (figuras 2A y B). En vista del hecho de que las muestras normales de líquido sinovial no están disponibles con facilidad, las muestras de OA se pueden considerar como controles no inflamatorios.

Los pacientes de SpA (0,84) mostraron proporciones significativamente inferiores ($p = 0,03$) de concentración de GDF15 (muestras de suero / líquido sinovial) en comparación con los pacientes de RA (1,15) (figura 3). En la presente memoria se añade una manera adicional de distinguir entre las dos principales artropatías inflamatorias, SpA y RA.

Las sensibilidades y especificidades se calcularon junto con el intervalo de confianza (CI) del 95%. Se generó una curva de características operativas del receptor (ROC) representando gráficamente la sensibilidad (eje Y) frente a 1-especificidad (eje X).

5 El ABC del análisis de la curva ROC para GDF15 en muestras de suero de SpA frente a RA (figura 4) es 0,837 (95% CI, 0,762-0,912). El ABC del análisis de la curva ROC para GDF15 en muestras de líquido sinovial de SpA frente a RA es 0,678 (95% CI, 0,569-0,787).

10 Los diferentes valores de corte con sus sensibilidades y especificidades (y sus CIs del 95% correspondientes) del ensayo de GDF15 para suero se enumeran en la Tabla 1. La puntuación de la concentración de GDF15 en una muestra de suero por debajo de los valores de corte respectivos permite identificar a un paciente como un paciente de SpA con las sensibilidades y especificidades correspondientes.

15 Tabla 1. Rendimiento de diagnóstico de GDF15 como marcador sérico a diferentes valores de corte elegidos para obtener diferentes especificidades.

Concentración de corte (pg/ml)	Sensibilidad % (95% CI)	Especificidad % (95% CI)
900	94,3 (88,8-97,6)	42,1 (32,1-48,2)
800	90,0 (84,0-94,5)	52,6 (41,5-60,9)
700	82,9 (76,4-87,8)	73,7 (61,9-82,8)
600	74,3 (67,7-79,4)	76,3 (64,1-85,7)
500	64,3 (57,7-68,6)	84,2 (72,4-92,1)
400	0,5 (45-51,2)	97,4 (88,1-99,5)

Ejemplo 3. Análisis de anti-CCP como un marcador de RA adicional

20 Se determinó el valor del marcador GDF15 y anti-CCP como un marcador adicional bien conocido estudiando la probabilidad de distinguir los pacientes de RA y SpA basándose en diferentes valores de corte de la concentración de GDF15 y la presencia/ausencia de una señal de CCP. Se sabe en general que el ensayo de anti-CCP tiene una especificidad muy elevada para RA y una sensibilidad relativamente baja para detectar un paciente de RA.

25 Se cribaron en 32 pacientes de RA y 33 pacientes de SpA los niveles séricos de GDF15 y las concentraciones de anti-CCP. 20 de los 32 pacientes de RA diagnosticados clínicamente fueron positivos para anti-CCP. Solamente 2 pacientes de SpA diagnosticados clínicamente fueron positivos para anti-CCP, lo que indica la especificidad elevada y la sensibilidad más bien razonable del ensayo. En el grupo de pacientes de RA negativos para anti-CCP, se aplicó GDF15 como un criterio adicional: las muestras por debajo de un umbral de 700/800/900 pg/ml se consideraron como pacientes de SpA, y las muestras por encima de este umbral como pacientes que no eran de SpA. Esto demostró que se pudieron clasificar correctamente 9/7/6 pacientes que no eran de SpA verdaderos adicionales. Solamente 3/3/2 de 31 pacientes de SpA negativos para anti-CCP fueron positivos para GDF15. Estos datos indican que la combinación de GDF15 con un marcador adicional, tal como el ensayo de anti-CCP, produce una sensibilidad sustancialmente incrementada al ensayo de distinción de RA-SpA. Estos datos indican que la combinación de GDF15 con un marcador adicional produce una sensibilidad sustancialmente incrementada al ensayo de distinción de RA-SpA. (Figura 5).

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso del factor de diferenciación del crecimiento 15 (GDF15) como un marcador in vitro para diferenciar la espondiloartropatía (SpA) de otras enfermedades reumáticas inflamatorias tales como artritis reumatoide (RA) o para predecir el desarrollo de SpA o RA a partir de la artritis indiferenciada.
- 10 2. El uso de GDF15 según la reivindicación 1 como un marcador in vitro para diferenciar SpA de RA o para predecir el desarrollo de SpA a partir de la artritis indiferenciada.
- 10 3. El uso según las reivindicaciones 1 ó 2 en el que GDF15 es parte de un panel de marcadores.
- 15 4. Un método in vitro para diferenciar SpA de otras enfermedades reumáticas inflamatorias tales como RA o para diferenciar SpA de la artritis indiferenciada, y dicho método comprende determinar la cantidad de factor de diferenciación del crecimiento 15 (GDF15) presente en una muestra biológica y correlacionar dicha cantidad determinada con la presencia o el desarrollo de SpA.
- 20 5. El método según la reivindicación 4, que comprende además comparar dicha cantidad determinada con un intervalo de cantidades de GDF 15, presente en más de una muestra biológica normal o de referencia.
- 20 6. El método según la reivindicación 4 ó 5, en el que la muestra biológica es una muestra de suero sanguíneo o una muestra de líquido sinovial.
- 25 7. El método según la reivindicación 4 ó 5, en el que la cantidad de GDF15 se determina en una muestra de suero sanguíneo y una muestra de líquido sinovial, y en el que la proporción de la cantidad de GDF15 en suero/líquido sinovial se correlaciona con la presencia o el desarrollo de SpA.
- 30 8. El método según la reivindicación 7 en el que la proporción de la cantidad de GDF 15 en el líquido sinovial / suero es elevada en SpA en comparación con RA.
- 30 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que la cantidad de GDF15 presente en la muestra biológica se determina mediante un inmunoensayo mediante el uso de anticuerpos, o fragmentos de los mismos, hacia GDF15.
- 35 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en el que la determinación de GDF15 se combina con la determinación de uno o más marcadores de las enfermedades reumáticas inflamatorias.
- 40 11. El método según la reivindicación 10 en el que el uno o más marcadores de la enfermedad reumática inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en un factor reumatoide y un anticuerpo hacia los péptidos citrulinados.

Figura 1(A)

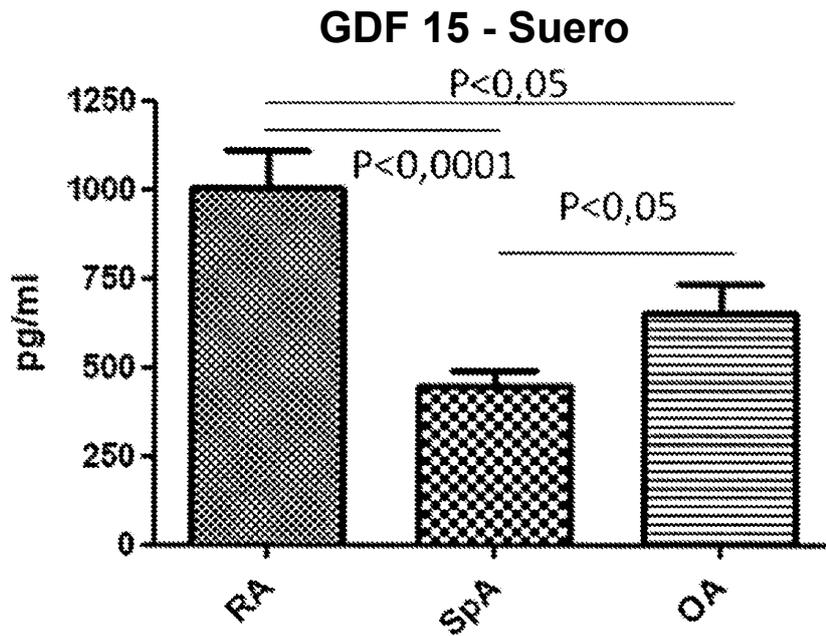


Figura 1(B)

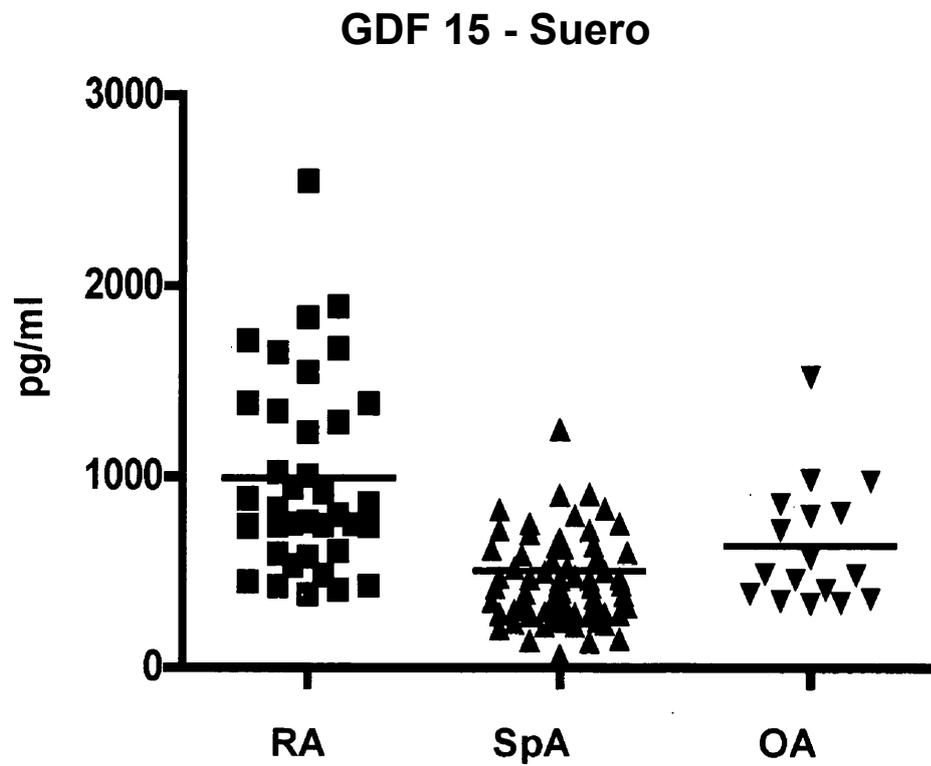


Figura 2(A)

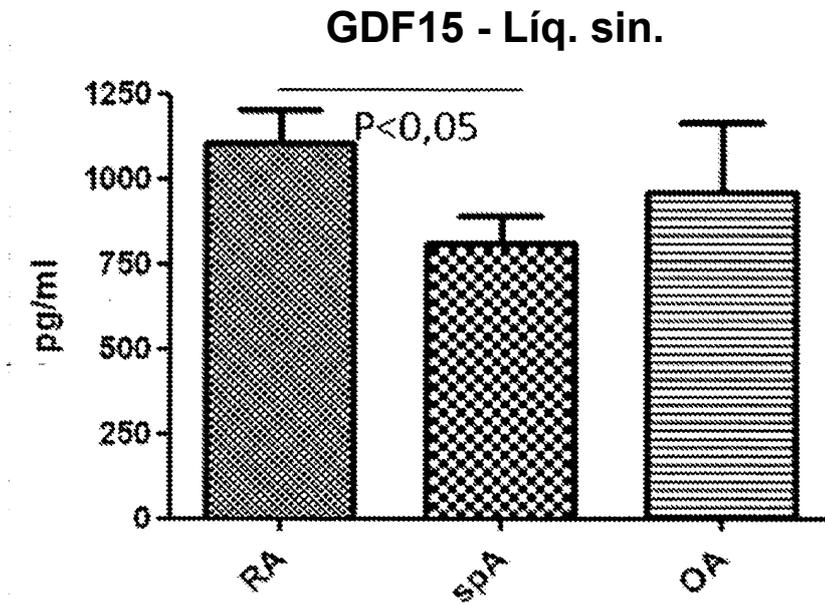


Figura 2(B)

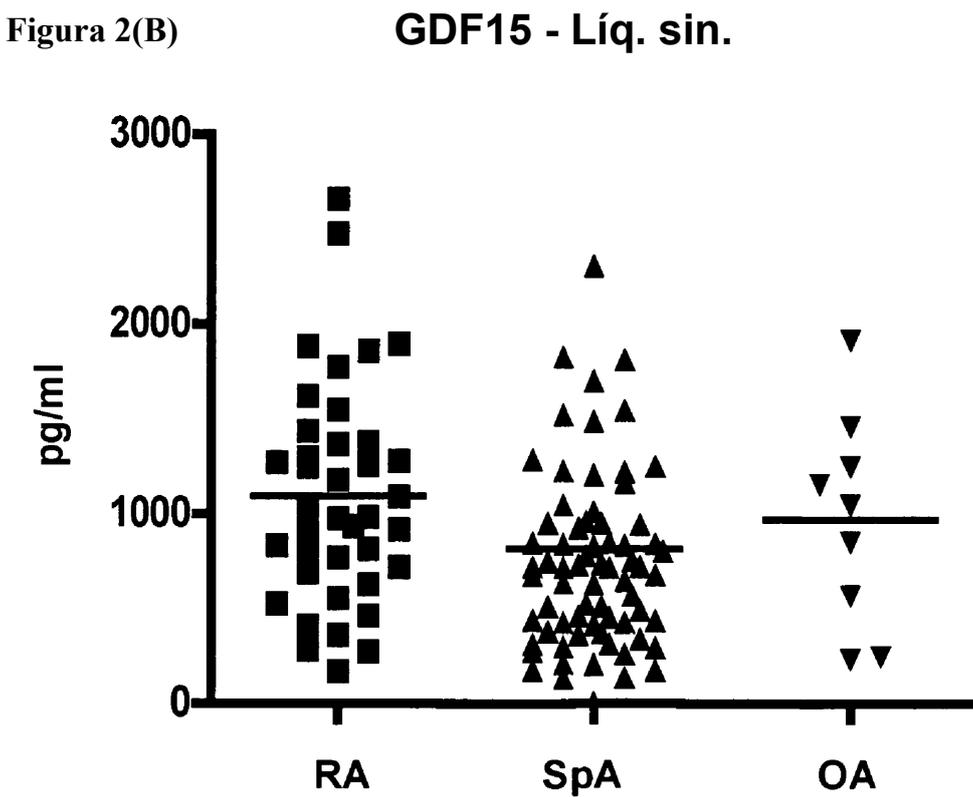


Figura 3

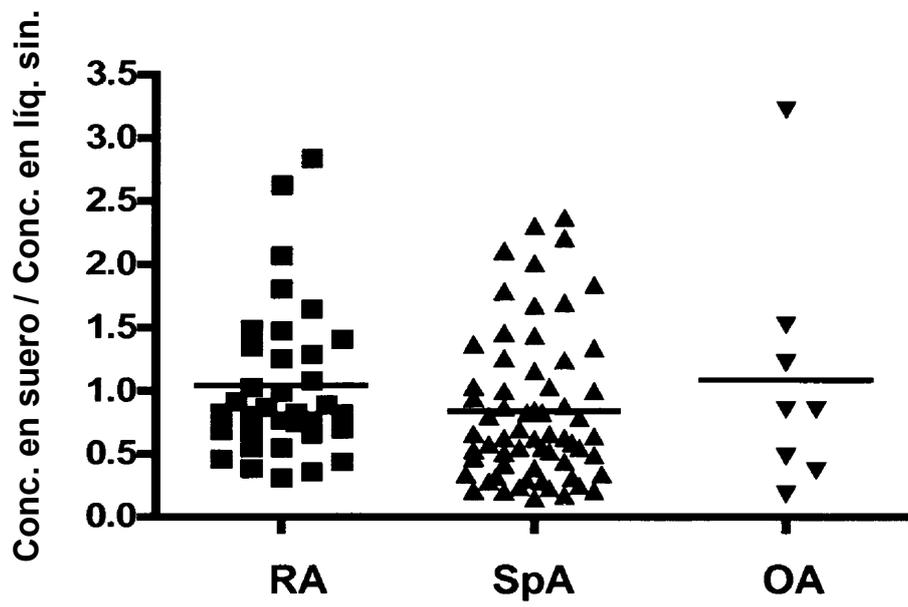


Figura 4

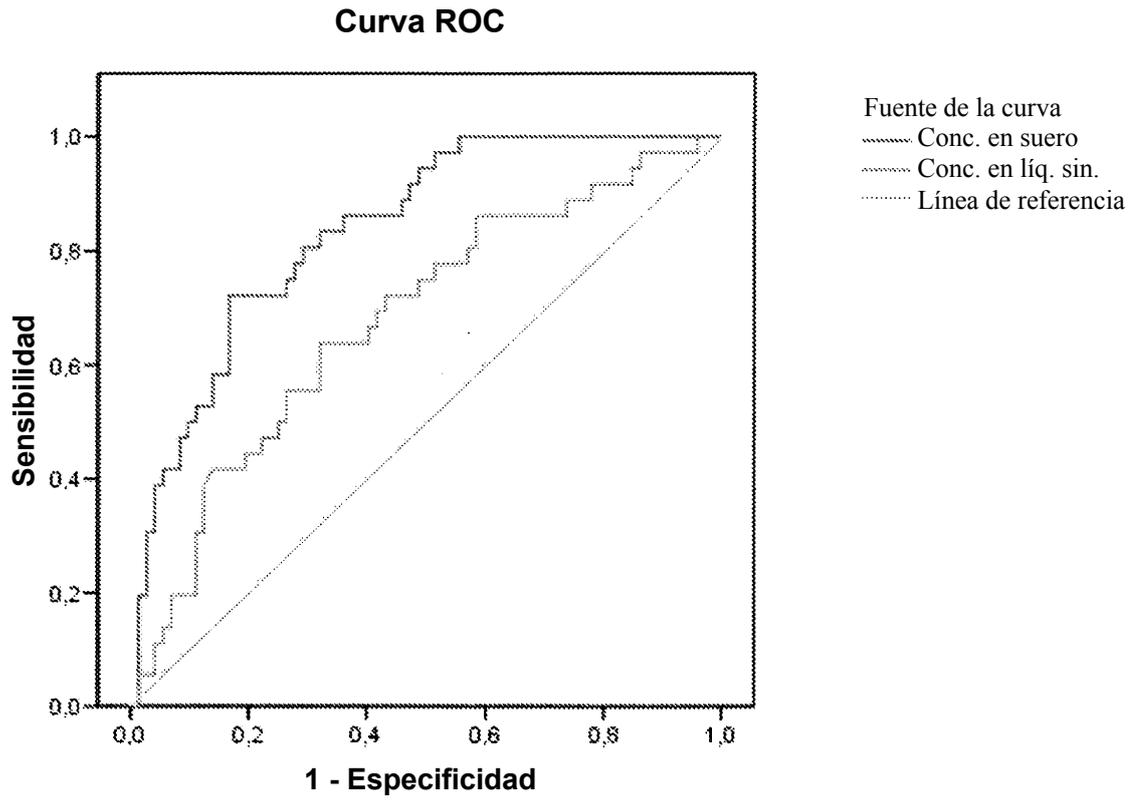


Figura 5

