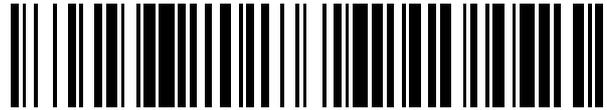


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 683**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2005 E 05707586 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015 EP 1721163**

54 Título: **Método para evaluar la artritis reumatoide mediante la medición del factor reumatoide y la interleuquina-6**

30 Prioridad:

27.02.2004 EP 04004536
08.04.2004 EP 04008586

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.07.2015

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE 124
4070 BASEL, CH

72 Inventor/es:

WILD, NORBERT;
KARL, JOHANN;
GRUNERT, VEIT PETER y
ZOLG, WERNER

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 541 683 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

Método para evaluar la artritis reumatoide mediante la medición del factor reumatoide y la interleuquina-6

5 La presente invención se refiere a un método de ayuda en la evaluación de la artritis reumatoide. El método se utiliza especialmente en la evaluación de la ausencia o presencia de la artritis reumatoide *in vitro*. El método se pone en práctica, por ejemplo, mediante el análisis de los marcadores bioquímicos, que comprende medir en una muestra la concentración del factor reumatoide (=FR) y de la interleuquina-6 y correlacionar las concentraciones determinadas con la ausencia o la presencia de artritis reumatoide. Para mejorar adicionalmente la evaluación de la AR en un
10 método de la presente invención, puede determinarse el nivel de uno o más marcadores adicionales conjuntamente con el FR y la interleuquina-6 y correlacionarse con la ausencia o la presencia de AR. La invención se refiere además a la utilización de un panel de marcadores que comprende FR e interleuquina-6 en el diagnóstico de la artritis reumatoide y enseña un kit para llevar a cabo el método de la invención.

15 La artritis reumatoide ("AR") es una enfermedad sistémica inflamatoria crónica que produce sus manifestaciones más prominentes en las articulaciones afectadas, particularmente de las manos y los pies. La aparición de la artritis reumatoide puede producirse lentamente, estando comprendida entre unas cuantas semanas y unos cuantos meses, o la condición puede aparecer rápidamente de manera aguda.

20 La AR presenta una distribución mundial e implica todos los grupos étnicos. Aunque la enfermedad puede producirse a cualquier edad, la prevalencia se incrementa con la edad y la incidencia máxima se observa entre la cuarta y la sexta décadas de la vida. Las estimaciones de prevalencia para la población norteamericana varían entre 0,3% y 1,5%. Actualmente se diagnostican más de 2.500.000 individuos con artritis reumatoide sólo en los Estados Unidos, indicando algunas estadísticas que entre 6,5 y 8 millones están potencialmente afectados por la
25 enfermedad. Las mujeres resultan afectadas 2 a 3 veces con mayor frecuencia que los hombres.

Los síntomas tempranos de artritis reumatoide son mayoritariamente específicamente articulares, tales como articulaciones dolorosas con hinchazón o sensibilidad de la articulación, aunque pueden incluir también manifestaciones más bien no específicas, tales como rigidez, fiebre, nódulos subcutáneos y fatiga. Es muy
30 característica la afectación simétrica de las articulaciones. Las articulaciones de las manos, pies, rodillas y muñecas son las más comúnmente afectadas, con afectación finalmente de las caderas, codos y hombros. A medida que avanza la enfermedad, cualquier tipo de movimiento se vuelve muy doloroso y difícil, conduciendo finalmente a una pérdida de la función de las articulaciones afectadas. Los casos más graves de artritis reumatoide pueden conducir a dolor intenso y destrucción de la articulación. Se llevan a cabo cada año unos 300.000 procedimientos quirúrgicos de sustitución ósea y articular en un esfuerzo por aliviar el dolor y pérdida de movilidad resultantes de la destrucción
35 articular relacionada con la artritis.

El sistema más ampliamente utilizado para clasificar la AR son los criterios revisados de la American College of Rheumatology 1987 para la clasificación de la AR (Arnett F. C. *et al.*, *Arthritis Rheum.* 31:315-324, 1988). Según
40 dichos criterios (conocidos como criterios ARA), se afirma que un paciente presenta AR en el caso de que el paciente satisfaga por lo menos cuatro de los siete criterios siguientes, en donde los criterios 1 a 4 deben encontrarse presentes durante como mínimo seis semanas: 1) rigidez matutina durante por lo menos una hora, 2) artritis de tres o más áreas articulares, 3) artritis de las articulaciones de la mano, 4) artritis simétrica, 5) nódulos reumatoides, 6) factor reumatoide ("FR") sérico, y 7) cambios radiográficos. Estos criterios presentan una
45 sensibilidad y especificidad de aproximadamente 90%.

El único marcador bioquímico generalmente aceptado (ver los criterios ARA anteriormente indicados) y que ayuda en el diagnóstico de la AR es el factor reumatoide (FR) detectado en el suero.

50 Keyszer G. *et al.* (*The Journal of Rheumatology* 26/2:251-258, 1999) han investigado la correlación entre marcadores tales como las metaloproteinasas MMP-3 y MMP-1, respectivamente, el inhibidor tisular de la metaloproteinasa 1 (TIMP-1) y el complejo MMP-1/TIMP-1 y la actividad de la enfermedad en la artritis reumatoide. Compararon dichos marcadores con otros marcadores sustitutivos tales como CRP, IL-6 o el factor reumatoide y encontraron que la CRp presentaba la mejor correlación con la actividad de la enfermedad.

55 Hidetsugu H. *et al.* (*The Japanese Journal of Clinical Pathology* 51:13-18, 2003) han investigado la significación clínica de marcadores tales como MMP-3, IL-6, IL-8 y el factor reumatoide. Encontraron que los niveles de MMP-3 en los pacientes de AR eran significativamente superiores a los observados en pacientes de OA o en los controles sanos.

60 Luqmani R. *et al.* (*Clinical and Experimental Rheumatology* 12:503-508, 1994) investigaron si las mediciones sistémicas de citoquinas podrían presentar algún papel en el seguimiento de la respuesta a la terapia en los

pacientes de AR. Concluyeron que: "La medición de los niveles circulantes de citoquinas en pacientes con artritis reumatoide es de utilidad limitada, ...".

5 Los cambios histológicos en la AR no son específicos de la enfermedad sino que dependen en gran medida del órgano implicado. La lesión articular inflamatoria primaria implica el sinovio. Los primeros cambios son la lesión de la microvasculatura sinovial con oclusión del lumen, la hinchazón de las células endoteliales y los huecos entre las células endoteliales, tal como se ha documentado mediante microscopía electrónica. Este estadio habitualmente se encuentra asociado a la proliferación leve de la capa celular de revestimiento superficial. Dos tipos celulares constituyen el revestimiento sinovial: el sinoviocito de tipo A derivado de la médula ósea, que presenta características de macrófago, y el sinoviocito de tipo B mesenquimal. Ambos tipos celulares contribuyen a la hiperplasia sinovial, sugiriendo una interacción paracrina entre estos dos tipos celulares. Este estadio de inflamación se asocia a congestión, edema y exudados de fibrina. Se produce la infiltración celular en las etapas tempranas de la enfermedad e inicialmente consiste principalmente de linfocitos T. Como consecuencia de la inflamación, el sinovio se vuelve hipertrófico por la proliferación de vasos sanguíneos y fibroblastos sinoviales y por la multiplicación y agrandamiento de las capas de revestimiento sinovial.

El tejido de granulación se extiende al cartílago y es conocido como pannus. El tejido invade activamente y destruye el hueso periarticular y el cartílago en el límite entre el sinovio y el hueso, lo que se conoce como AR erosiva.

20 Las manifestaciones articulares de la AR puede clasificarse en dos categorías: signos y síntomas reversibles relacionados con la sinovitis inflamatoria y daños estructurales irreversibles causados por sinovitis. Este concepto resulta útil no sólo para la estadificación de la enfermedad y la determinación del pronóstico, sino también para la selección del tratamiento médico o quirúrgico. El daño estructural en el paciente típico habitualmente se inicia en algún momento entre el primer y segundo años de la enfermedad (Van der Heijde D.M., Br. J. Rheumatol. 34:74-78, 1995). Aunque la sinovitis tiende a seguir un patrón fluctuante, el daño estructural progresa como una función lineal de la cantidad de sinovitis previa.

30 Sigue sin conocerse la etiología de los sucesos tempranos de la AR. Actualmente está ampliamente aceptado el componente autoinmunitario, aunque todavía se debaten otros factores. Se ha investigado activamente la posibilidad de una infección bacteriana o vírica. Todos los esfuerzos para asociar un agente infeccioso a la AR mediante aislamiento, microscopía electrónica o biología molecular han sido infructuosos. Posiblemente no existe una única causa primaria de AR y que diferentes mecanismos conduzcan a la lesión inicial del tejido y precipiten la inflamación sinovial.

35 Los signos clínicos de la sinovitis pueden ser sutiles y con frecuencia son subjetivos. Habitualmente sólo se observan articulaciones calientes, hinchadas y evidentemente inflamadas en las etapas más activas de la sinovitis inflamatoria. La pérdida de cartílago y la erosión del hueso periarticular son los elementos característicos del daño estructural. Las características clínicas relacionadas con el daño estructural están marcadas por un deterioro progresivo funcional y anatómico. El daño estructural de la articulación es irreversible y aditivo.

40 El tratamiento eficaz de la artritis reumatoide generalmente comprende una combinación de medicación, ejercicio, reposo y una terapia adecuada de protección articular. La terapia para el paciente individual depende de la gravedad de la enfermedad y de las articulaciones afectadas. Se utilizan ampliamente los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, los corticosteroides, las sales de oro, el metotrexato y los inmunosupresores sistémicos para reducir la inflamación y la destrucción articular. Sin embargo, la utilización de esteroides e inmunosupresores presenta riesgos y efectos secundarios significativos, tanto en términos de toxicidad como de vulnerabilidad frente a condiciones potencialmente letales. Más recientemente, se han introducido en la terapia de la AR terapéuticos basados en productos biológicos. Dichos terapéuticos, por ejemplo son receptores solubles o anticuerpos dirigidos contra TNF- α que reducen significativamente la inflamación. Aunque muy prometedores, los productos biológicos todavía se utilizan limitadamente debido a su elevado coste.

55 Los datos de estudios clínicos y epidemiológicos longitudinales proporcionan directrices para el tratamiento. Estos estudios subrayan: 1) la necesidad de un diagnóstico precoz, 2) la identificación de factores pronósticos, y 3) el tratamiento agresivo temprano. El diagnóstico y tratamiento más tempranos, preferentemente dentro de los primeros pocos meses después de la aparición de síntomas, podrían ayudar a evitar el daño articular irreversible.

60 Por lo tanto, existe una necesidad de métodos, especialmente basados en parámetros bioquímicos, que ayuden en la evaluación de la artritis reumatoide. La presente invención proporciona dichos métodos y reactivos para la evaluación de la ausencia o presencia de la artritis reumatoide *in vitro*. Los métodos también ayudarán en el seguimiento de la eficacia del tratamiento en pacientes que sufren de AR.

La presente invención se refiere a un método para evaluar la artritis reumatoide *in vitro* utilizando marcadores bioquímicos, que comprende medir en una muestra la concentración de FR e interlequina-6 mediante la combinación

matemática de los valores medidos de FR e IL-6 utilizando análisis discriminante, métodos núcleo, métodos no paramétricos, cuadrados mínimos parciales, métodos basados en árboles, modelos lineales generalizados, métodos basados en componentes principales, modelos aditivos generalizados, métodos basados en lógica difusa, o métodos basados en redes neuronales o en algoritmos genéticos, y la correlación de las concentraciones determinadas con la ausencia o la presencia de artritis reumatoide.

La presente invención se refiere además a la utilización de un panel de marcadores que comprende por lo menos FR e interleuquina-6 en el diagnóstico de la AR.

En una primera realización, la presente invención se refiere a un método para evaluar la artritis reumatoide *in vitro* utilizando marcadores bioquímicos, que comprende medir en una muestra la concentración de FR e interleuquina-6, mediante la combinación matemática de los valores medidos de FR e IL-6 utilizando análisis discriminante, métodos núcleo, métodos no paramétricos, cuadrados mínimos parciales, métodos basados en árboles, modelos lineales generalizados, métodos basados en componentes principales, modelos aditivos generalizados, métodos basados en lógica difusa, o métodos basados en redes neuronales o en algoritmos genéticos, y la correlación de las concentraciones determinadas con la ausencia o la presencia de artritis reumatoide.

Tal como se utiliza en la presente memoria, cada uno de los términos siguientes presenta el significado asociado en la presente sección.

Los artículos "un" y "una" se utilizan en la presente memoria para referirse a uno o a más de uno (es decir, a por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A título de ejemplo, "un marcador" se refiere a un marcador o a más de un marcador.

El término "marcador" o "marcador bioquímico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula que debe utilizarse como diana para el análisis de una muestra de ensayo de un paciente. Son ejemplos de dichas dianas moleculares, proteínas o polipéptidos así como anticuerpos presentes en la muestra. Las proteínas o polipéptidos utilizados como marcador en la presente invención se contempla que incluyan variantes naturales de dichas proteínas, así como fragmentos de dichas proteínas o de dichas variantes, en particular fragmentos inmunológicamente detectables. El experto en la materia reconocerá que las proteínas liberadas por las células o que se encuentran presentes en la matriz extracelular pueden resultar dañadas, por ejemplo durante la inflamación, y que podrían resultar degradadas o cortadas formando dichos fragmentos. Determinados marcadores se sintetizan en una forma inactiva, que puede ser activada posteriormente mediante proteólisis. Tal como apreciará el experto en la materia, también pueden encontrarse presentes proteínas o fragmentos de las mismas como parte de un complejo. Dicho complejo también puede utilizarse como marcador en el sentido de la presente invención. Las variantes de un polipéptido marcador se encuentran codificadas por el mismo gen pero difieren en su PI o PM o ambos (por ejemplo como resultado del procesamiento alternativo del ARNm o pre-ARNm, por ejemplo el procesamiento alternativo o la proteólisis limitada) y además, o alternativamente, pueden aparecer por la modificación post-traducciona diferencial (por ejemplo la glucosilación, la acilación y/o la fosforilación).

El término marcador tal como se ha indicado anteriormente según la presente invención se refiere además a anticuerpos presentes en una muestra. En el caso de la AR, estos anticuerpos son autoanticuerpos, es decir, anticuerpos en una muestra del paciente que se unen a un antígeno presente o producido por las propias células del paciente.

El término "muestra" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una muestra biológica obtenida para el propósito de la evaluación *in vitro*. En los métodos de la presente invención, la muestra, o muestra procedente de un paciente, preferentemente puede comprender cualquier líquido corporal. Entre las muestras de ensayo preferentes se incluyen sangre, suero, plasma, orina, saliva y líquido sinovial. Las muestras preferentes son sangre completa, suero, plasma o líquido sinovial, siendo el plasma o el suero las más preferentes.

Tal como apreciará el experto en la materia, cualquiera de dichos diagnósticos se realiza *in vitro*. Posteriormente se descarta la muestra del paciente. La muestra del paciente se utiliza únicamente para el método diagnóstico *in vitro* de la invención y el material de la muestra del paciente no se transfiere nuevamente al cuerpo del paciente. Típicamente la muestra es una muestra líquida.

La expresión "evaluar la artritis reumatoide" se utiliza para indicar que el método según la presente invención ayudará (conjuntamente con otras variables, por ejemplo los criterios indicados por la ARA (ver anteriormente)) al médico a establecer su diagnóstico de la AR. En una realización preferente dicha evaluación se relaciona con la presencia o la ausencia de AR. Tal como apreciará el experto en la materia ningún marcador bioquímico es diagnóstico con una especificidad de 100% y simultáneamente una sensibilidad de 100% para una enfermedad dada, por el contrario los marcadores bioquímicos se utilizan para evaluar con una determinada probabilidad o valor

predictivo la presencia o ausencia de una enfermedad. Preferentemente el método según la presente invención ayuda en la evaluación de la presencia o la ausencia de la AR.

5 Tal como apreciará el experto en la materia, la etapa de correlación del nivel de un marcador con la presencia o la ausencia de la AR puede llevarse a cabo y conseguirse de diferentes maneras. En general se selecciona una población de referencia y se establece un intervalo normal. No requiere más que experimentación rutinaria el establecimiento del intervalo normal para tanto el FR como la interleuquina-6 utilizando una población de referencia apropiada. Está generalmente aceptado que el intervalo normal en un determinado aunque limitado grado depende de la población de referencia en la que se establece. La población de referencia ideal presenta un número elevado, por ejemplo cientos a miles, y presenta edades, géneros y opcionalmente otras variables de interés, correspondientes. El intervalo normal en términos de valores absolutos, tal como una concentración dada, depende también del ensayo utilizado y de la estandarización utilizada para producir el ensayo.

15 Los niveles de FR y de interleuquina-6 han sido medidos y establecidos con procedimientos de ensayo proporcionados en la sección de Ejemplos. Debe entenderse que diferentes ensayos pueden conducir a diferentes valores de corte sin apartarse del alcance de la presente invención.

20 Los medios preferentes para la detección del FR y la interleuquina-6, respectivamente, son ensayos de unión específicos, especialmente inmunoensayos. Los inmunoensayos son bien conocidos por el experto en la materia. Los métodos para llevar a cabo dichos ensayos, así como las aplicaciones y procedimientos prácticos se resumen en manuales relacionados. Son ejemplos de libros de texto relacionados, Tijssen P., en: Practice and theory of enzyme immunoassays, eds. R. H. Burdon y v. P. H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam (1990) 221-278 y diversos volúmenes de Methods in Enzymology, eds. S. P. Colowick, N. O. Caplan y S. P., Academic Press, referidos a métodos inmunológicos de detección, especialmente los volúmenes 70, 73, 74, 84, 92 y 121.

25 Los anticuerpos de FR pueden detectarse mediante formatos de ensayo homogéneos, por ejemplo mediante aglutinación de partículas de látex recubiertas con antígeno FR.

30 Los factores reumatoides (=FR) son autoanticuerpos dirigidos contra la región Fc constante de las moléculas de inmunoglobulina G (Waalder E., Acta Pathol. Microbiol. Scand. 17:172-188, 1940; Moore T.L. y Dorner R.N., Clin. Biochem. 26:75-84, 1993). Aunque el FR presenta algunas limitaciones, actualmente es el único marcador inmunológico de la artritis reumatoide incluido en los criterios de la ARA. Además de en la AR, también se observa en otras enfermedades reumáticas inflamatorias, enfermedades no reumáticas e incluso en personas sanas de más de 60 años (Bartfeld H., Ann. NY Acad. Sci. 168:30-40, 1969). Los autoanticuerpos de FR pertenecen a todas las clases de inmunoglobulina y la mayoría de los ensayos utilizados actualmente no diferencian entre los isotipos IgM, IgG e IgA. Estos ensayos de FR, también denominados ensayos de FR total, determinan mayoritariamente IgM, aunque también cubren IgG o IgA en cierto grado, según el formato de ensayo y el proveedor (Bas S. *et al.*, Ann. Rheum. Dis. 61:505-510, 2002). Más recientemente, los isotipos IgG e IgA de FR han concentrado la atención en el diagnóstico de la AR. En el caso de que los tres isotipos de FR se encuentren elevados, podría mejorarse el valor diagnóstico del ensayo de FR (Swedler W. *et al.*, J. Rheumatol. 24:1037-1044, 1997). Además, se ha atribuido cierto valor pronóstico a algunos de dichos isotipos de FR. Especialmente se ha observado que una concentración elevada del FR de tipo IgA es un indicador de progresión a enfermedad grave (Jorgensen C. *et al.*, Clin. Exp. Rheum. 14:303-304, 1996). En una combinación de marcadores según la presente invención, el marcador FR puede ser cualquier forma de determinación de FR, incluyendo FR total, isotipos individuales de FR específicos o cualquier combinación de isotipos de FR. La forma preferente de un marcador de FR para dicha combinación de marcadores es el FR total.

50 La interleuquina-6 (IL-6) es un proteína secretada de 21 kDa que presenta numerosas actividades biológicas que pueden dividirse en las que participan en la hematopoyesis y las que participan en la activación de la respuesta inmunológica innata. La IL-6 es un reactivo de fase aguda y estimula la síntesis de una diversidad de proteínas, incluyendo las moléculas de adhesión. Su función principal es mediar en la producción en fase aguda de las proteínas hepáticas, y su síntesis resulta inducida por las citoquinas IL-1 y TNF- α . IL-6 es normalmente producida por los macrófagos y los linfocitos T. La concentración sérica normal de IL-6 es <5 pg/ml.

55 Mientras que para FR se miden los (auto)anticuerpos comprendidos en una muestra, para IL-6 se detecta la molécula marcadora IL-6 misma. IL-6 puede medirse, por ejemplo, mediante un inmunoensayo de tipo competitivo o de tipo sándwich. IL-6 se mide preferentemente en un inmunoensayo de tipo sándwich que se basa esencialmente en un anticuerpo de unión específica a IL-6 que se une directa o indirectamente o que es capaz de unirse a una fase sólida, un anticuerpo de unión específica a IL-6 que se encuentra detectablemente marcado y la incubación de dichos reactivos bajo condiciones que permitan la unión de los anticuerpos anti-IL-6 a IL-6 en una muestra, la separación del anticuerpo detectablemente marcado no unido, la determinación de la cantidad de anticuerpo marcado unido mediante IL-6 y la correlación de la cantidad de anticuerpo marcado unido con la concentración de IL-6 en la muestra.

5 El escenario ideal para el diagnóstico sería una situación en la que un suceso o un proceso individual causaría la enfermedad respectiva, tal como, por ejemplo, en las enfermedades infecciosas. En todos los demás casos, el diagnóstico correcto puede resultar muy difícil, especialmente en el caso de que la etiología de la enfermedad no se comprenda completamente, tal como es el caso de la AR. Por lo tanto, generalmente se consideran conjuntamente diversos síntomas clínicos y marcadores biológicos en el diagnóstico de la AR. Los marcadores pueden determinarse individualmente o, en una realización preferente de la invención, pueden medirse simultáneamente utilizando un chip o una tecnología de matrices basada en perlas.

10 En un método según la presente invención se determinan por lo menos las concentraciones de los marcadores biológicos FR e IL-6, y la combinación de marcadores se correlaciona con la ausencia o la presencia de AR.

15 Tal como se muestra en la sección de Ejemplos, la mera combinación de los dos marcadores FR e IL-6 mejora significativamente la exactitud diagnóstica de la AR.

20 Tal como apreciará el experto en la materia, existen muchas maneras de utilizar las mediciones de dos o más marcadores para mejorar la respuesta a la cuestión diagnóstica investigada. En un enfoque bastante simple, aunque con frecuencia efectivo, se considera que el resultado es positivo si una muestra obtiene un resultado positivo en por lo menos uno de los marcadores investigados. Éste puede ser el caso, por ejemplo, al diagnosticar una enfermedad infecciosa, por ejemplo el SIDA. Sin embargo, con frecuencia se evalúa la combinación de marcadores. Preferentemente, los valores medidos de los marcadores de un panel de marcadores, por ejemplo de FR e IL-6, se combinan matemáticamente y el valor combinado se correlaciona con la cuestión diagnóstica subyacente. Pueden combinarse valores de marcadores mediante cualquier método matemático apropiado del estado de la técnica. Algunos métodos matemáticos bien conocidos de correlación de una combinación de marcadores con una enfermedad aplican métodos tales como el análisis discriminante (AD) (por ejemplo el AD lineal, cuadrático o regularizado), los métodos de núcleo (por ejemplo SVM), los métodos no paramétricos (por ejemplo los clasificadores del vecino k más próximo), PLS (es decir, los cuadrados mínimos parciales), los métodos basados en árboles (por ejemplo la regresión lógica, CART, los métodos de bosque aleatorio y los métodos de boosting/bagging), los modelos lineales generalizados (por ejemplo la regresión logística), los métodos basados en los componentes principales (por ejemplo el SIMCA), los modelos aditivos generalizados, los métodos basados en lógica difusa, y los métodos basados en redes neuronales y algoritmos genéticos. Resultará fácil para el experto en la materia seleccionar un método apropiado para evaluar una combinación de marcadores de la presente invención. Preferentemente, el método utilizado en la correlación de la combinación de marcadores de la invención, por ejemplo con la ausencia o presencia de AR se selecciona de entre AD (es decir, análisis discriminante lineal, cuadrático o regularizado), los métodos de núcleo (es decir, SVM), los métodos no paramétricos (por ejemplo los clasificadores del vecino k más próximo), PLC (cuadrados mínimos parciales), los métodos basados en árboles (por ejemplo regresión lógica, CART, métodos de bosque aleatorio, métodos de Boosting) o los modelos lineales generalizados (por ejemplo la regresión logística). Pueden encontrarse detalles referentes a dichos métodos estadísticos en las referencias siguientes: Ruczinski, I. Kooperberg, C., LeBlanc, M., Logic regression, J. of Computational and Graphical Statistics, 12:475-511, 2003; Friedman J. H., JASA 84:165-175; Hastie, Trevor, Tibshirani, Robert, Friedman, Jerome, The Elements of Statistical Learning, Springer Series in Statistics, 2001; Breiman L., Friedman J. H., Olshen R. A., Stone C. J., Classification and regression trees, California: Wadsworth; Breiman, L. Random Forests, Machine Learning, 45:5-32, 2001; Pepe, M. S., The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction, Oxford Statistical Science Series, 28, 2003, y Duda, R. O., Hart, P. E., Stork, D. G., Pattern Classification, Wiley Interscience, 2a edición, 2001.

50 Es una realización preferente de la invención utilizar un valor de corte multivariante optimizado para la combinación subyacente de marcadores biológicos y para discriminar el estado A del estado B, por ejemplo pacientes enfermos de pacientes sanos. En este tipo de análisis, los marcadores ya no son independientes sino que forman un panel de marcadores. Pudo establecerse que la combinación de las mediciones de FR e IL-6 no mejora significativamente la exactitud diagnóstica de la AR en comparación con controles sanos o, tal como también se evaluó, en comparación con pacientes que presentaban osteoartritis (OA). Especialmente este último resultado es de gran importancia porque los pacientes con OA y AR, respectivamente, podrían requerir tratamientos bastante diferentes.

55 La exactitud de un método diagnóstico se describe mejor a partir de sus características operativas del receptor (ROC) (ver especialmente Zweig M.H. y Campbell G., Clin. Chem. 39:561-577, 1993). El gráfico de COR es un gráfico de todas las parejas de sensibilidad/especificidad resultantes de variar continuamente el umbral de decisión a lo largo del intervalo completo de datos observados.

60 El rendimiento clínico de un ensayo de laboratorio depende de su exactitud diagnóstica, o de la capacidad de clasificar correctamente los sujetos en subgrupos clínicamente relevantes. La exactitud diagnóstica mide la capacidad de un ensayo de distinguir correctamente dos condiciones diferentes de los sujetos investigados. Dichas condiciones son, por ejemplo, salud y enfermedad o enfermedad benigna frente a maligna.

En cada caso, el gráfico de COR ilustra el solapamiento entre las dos distribuciones a partir de un gráfico de la sensibilidad frente a 1-especificidad para el intervalo completo de umbrales de decisión. En el eje y se encuentra la sensibilidad, o la fracción de positivos verdaderos [definida como (número de resultados de ensayo positivos verdaderos)/(número de positivos verdaderos + números de resultados de ensayo falsos negativos)]. Lo anterior también se ha denominado positividad en presencia de una enfermedad o condición. Se calcula únicamente a partir del subgrupo afectado. En el eje x se encuentra la fracción falsa positiva, o 1-especificidad [definida como (número de resultados falsos positivos)/(número de negativos verdaderos + número de resultados falsos positivos)]. Es un índice de la especificidad y se calcula por completo a partir del subgrupo no afectado. Debido a que las fracciones positivas verdaderas y falsas positivas se calculan completamente por separado, mediante la utilización de los resultados de ensayo de dos subgrupos diferentes, el gráfico de ROC es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto del gráfico de ROC representa una pareja de sensibilidad/1-especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Un ensayo con discriminación perfecta (sin solapamiento de las dos distribuciones de los resultados) presenta un gráfico de ROC que pasa a través de la esquina superior izquierda, mientras que la fracción positiva verdadera es 1,0 ó 100% (sensibilidad perfecta) y la fracción de falsos positivo es 0 (especificidad perfecta). El gráfico teórico para un ensayo sin discriminación (distribuciones idénticas de los resultados de los dos grupos) es una línea diagonal a 45° desde la esquina inferior izquierda y la esquina superior derecha. La mayoría de los gráficos se encuentra entre ambos extremos (en el caso de que el gráfico de ROC se encuentre completamente debajo de la diagonal a 45°, se soluciona fácilmente invirtiendo el criterio de "positividad" de "mayor que" a "menor que", o viceversa). Cualitativamente, cuanto más próximo se encuentre el gráfico a la esquina superior izquierda, mayor será la exactitud global del ensayo.

Un modo preferente de cuantificar la exactitud diagnóstica de un ensayo de laboratorio es expresar su rendimiento mediante un único número. La medida global más común es el área bajo el gráfico de ROC. Convencionalmente este área en todos los casos es >0,5 (en el caso de que no se cumpla esta condición, puede revertirse la regla de decisión para que sí se cumpla). Los valores comprendidos entre 1,0 (separación perfecta de los valores de ensayo de los dos grupos) y 0,5 (sin ninguna diferencia aparente entre las distribuciones de los dos grupos de valores de ensayo). El área no sólo depende de una parte particular del gráfico, tal como el punto más próximo a la diagonal o la sensibilidad a una especificidad del 90%, sino del gráfico completo. Ésta es una expresión descriptiva cuantitativa de la proximidad del gráfico de ROC a un gráfico perfecto (área = 1,0).

En una realización preferente, la presente invención se refiere a un método para mejorar la exactitud diagnóstica de la artritis reumatoide frente a los controles sanos y/o los pacientes que sufren de OA mediante la medición en una muestra de la concentración de por lo menos FR e interleuquina-6 y la correlación de las concentraciones determinadas con la presencia o la ausencia de artritis reumatoide, resultando la mejora en más pacientes correctamente clasificados como pacientes de AR frente a controles sanos y/o pacientes que sufren OA, en comparación con la clasificación basada únicamente en FR. El panel de marcadores de la AR que comprende FR e IL-6 evidentemente también puede utilizarse para evaluar la gravedad de la enfermedad de los pacientes que sufren AR.

Tal como apreciará el experto en la materia, puede utilizarse uno o más marcadores biológicos para mejorar adicionalmente la evaluación de la AR. A fin de ilustrar este potencial adicional de la utilización de FR e IL-6 como marcadores clave de un panel de marcadores para la evaluación de la AR, se ha utilizado la expresión "por lo menos" en las reivindicaciones adjuntas. En otras palabras, el nivel medido para uno o más marcadores adicionales puede combinarse con la medición de FR e IL-6 en la evaluación de la AR.

El marcador o marcadores adicionales utilizados conjuntamente con FR e IL-6 pueden considerarse parte de un panel de marcadores de la AR, es decir, una serie de marcadores apropiados para refinar adicionalmente la evaluación de la AR. El número total de marcadores en un panel de marcadores de la AR preferentemente es inferior a 20 marcadores, más preferentemente es inferior a 15 marcadores, también preferentemente es inferior a 10 marcadores, siendo todavía más preferente 8 o menos marcadores. Resultan preferentes los paneles de marcadores de la AR que comprenden 3, 4, 5 o 6 marcadores en total.

En una realización preferente, la presente invención se refiere de esta manera a un método para evaluar la ausencia o la presencia de artritis reumatoide *in vitro* utilizando marcadores bioquímicos, que comprende medir en una muestra la concentración de FR, interleuquina-6 y además la concentración de otro u otros marcadores y correlacionar las concentraciones de FR, IL-6 y el marcadores o marcadores adicionales con la ausencia o la presencia de artritis reumatoide.

Se apreciará que el otro u otros marcadores pueden ser cualquier marcadores conocido o futuro de AR. Un marcador se considera marcador de AR en el caso de que la ABC de este marcador por sí solo, durante la evaluación de la exactitud diagnóstica mediante la comparación de pacientes con AR con los controles sanos, sea de por lo menos 0,65.

Preferentemente el otro u otros marcadores se seleccionan de entre el grupo que consiste de proteína C reactiva (=CRP), amiloide A sérico (=AAS), S100, osteopontina, metaloproteasa-1 de matriz (=MMP-1), metaloproteasa-3 de matriz (=MMP-3), ácido hialurónico, sCD14, marcadores de angiogénesis y productos del metabolismo óseo, de cartílagos o del sinovio.

La proteína C reactiva (CRP) es una proteína homopentamérica de fase aguda de unión a Ca^{2+} con subunidades de 21 kDa que participa en la defensa del huésped. La síntesis de la CRP resulta inducida por la IL-6 e indirectamente por la IL-1, ya que la IL-1 puede inducir la síntesis de IL-6 por parte de las células de Kupffer en los sinusoides hepáticos. La concentración plasmática normal de CRP es <3 mg/ml (30 nM) en el 90% de la población sana y <10 mg/ml (100 nM) en el 99% de los individuos sanos. Las concentraciones plasmáticas de CRP pueden medirse, por ejemplo, mediante formatos de ensayo homogéneos o ELISA. La proteína C reactiva es un marcador de inflamación sistémica subyacente.

La osteopontina (=OPN) es una glucoproteína fosforilada secretada altamente ácida ligante de calcio. Se conocen tres isoformas que se originan por el procesamiento alternativo que se encuentran libres o unidas a la matriz extracelular. Mediante un motivo RDG del esqueleto peptídico de 32 kDa OPN puede unirse a integrinas tales como $\alpha v\beta 3$. Aunque se purificó originalmente a partir de la matriz ósea, se expresa en numerosos líquidos corporales y tejidos, incluyendo la leche, la orina, las células T activadas, los macrófagos, los fibroblastos, las células de músculo liso, el tejido renal y algunas células tumorales. Su expresión resulta estimulada en respuesta a varias citoquinas, factores de crecimiento o mediadores inflamatorios. Las concentraciones incrementadas de OPN se han asociado a sepsis, cáncer metastásico, isquemia cerebral, placas ateroscleróticas, formación de granuloma en la tuberculosis y enfermedades autoinmunitarias tales como la esclerosis múltiple (Chabas D. *et al.*, Science 294:1731-1735, 2001) o la AR (Petrow P.K. *et al.*, Arthritis Rheum. 43:1597-1605, 2000).

El amiloide A sérico (=AAS) es una proteína de fase aguda de bajo peso molecular (11,7 kDa). Es sintetizada predominantemente por el hígado en respuesta a la estimulación por IL-6, IL-6 o TNF- α y participa en la regulación de la respuesta inmunológica dependiente de las células T. En los sucesos agudos la concentración de la AAS se incrementa hasta 1.000 veces, alcanzando un miligramo por mililitro. Se utiliza para el seguimiento de la inflamación en enfermedades tan diversas como la fibrosis quística, el rechazo del injerto renal, traumatismos o infecciones (Mozes G. *et al.*, J. Trauma 29:71-74, 1989). En la artritis reumatoide se ha utilizado en determinados casos como sustituto de la CRP aunque la AAS todavía no se acepta tan ampliamente (Chambers R.E. *et al.*, Ann. Rheum. Dis. 42:665-667, 1983).

La familia de las metaloproteinasas de matriz (=MPM) degrada prácticamente todos los componentes de la matriz extracelular. Por lo tanto, las MPM se han relacionado con diversos tipos de células, aunque también a procesos inflamatorios en la AR. La MPM-1 y la MPM-3 son producidas por fibroblastos, osteoblastos y células endoteliales con la estimulación por citoquinas proinflamatorias como IL-1 o TNF- α . Generalmente las MPM se observan en la circulación como la proforma inactiva y el marcador MPM-1 y MPM-3, respectivamente, tal como se utiliza en la presente memoria se refiere también a dicha proforma inactiva. MPM-1 y MPM-3 han sido detectados en el líquido sinovial de los pacientes de AR y los niveles son sensibles a la terapia anti-TNF- α . La metaloproteasa más preferente que debe utilizarse en un panel de marcadores de AR según la presente invención es MPM-1. Más preferentemente se mide pro-MPM-1.

En lugar de las metaloproteinasas indicadas anteriormente también resulta posible utilizar sus inhibidores correspondientes, denominados colectivamente inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de matriz (ITMP), por ejemplo MPM-1 y MPM-3 resultan inactivados *in vivo* por ITMP-1, una sialoglicoproteína de 29,5 kD que forma un complejo estequiométrico 1:1 con las MPM. La relación de ITMP-1 e ITMP-2 con la destrucción del cartílago ha sido investigada en la AR (Ishiguro N. *et al.*, Arthritis Rheum. 44:2503-2511, 2001).

Las proteínas S100 forman una familia constantemente creciente de proteínas ligantes de Ca^{2+} que actualmente incluye más de 20 miembros. La estructura fisiológicamente relevante de las proteínas S100 es un homodímero, aunque algunas también pueden formar heterodímeros entre sí, por ejemplo S100A8 y S100A9. Las funciones intracelulares abarcan desde la regulación de la fosforilación de las proteínas, las actividades enzimáticas, la dinámica del citoesqueleto y la participación en la proliferación y diferenciación celulares. Debido a que algunas proteínas S100 también son liberadas por las células, también se han descrito funciones extracelulares, por ejemplo la supervivencia neuronal, la proliferación de los astrocitos, la inducción de la apoptosis y la regulación de los procesos inflamatorios. S100A8, S100A9, y los heterodímeros S100A8/A9 y S100A12 se han observado en la inflamación, respondiendo S100A8 a la inflamación crónica, mientras que S100A9, S100A8/A9 y S100A12 se encuentran incrementadas en la inflamación aguda. Se ha asociado S100A8, S100A9, S100A8/A9 y S100A12 a diferentes enfermedades con componentes inflamatorios, incluyendo algunos cánceres, el rechazo del aloinjerto renal, la colitis y, notablemente, con la AR (Burmeister G. y Gallacchi G., Inflammopharmacology 3:221-230, 1995; Foell D. *et al.*, Rheumatology 42:1383-1389, 2003). Los marcadores S100 preferentes para la utilización en un

panel de marcadores de AR según la presente invención son S100A8, S100A9, el heterodímero S100A8/A9 y S100A12.

5 CD14 es una proteína membranal de promonocitos, monocitos, macrófagos y granulocitos activados en los que sirve como un receptor para lipopolisacáridos. Induce la secreción de factores citotóxicos e inmunomoduladores como el oxígeno reactivo (O₂), el factor de necrosis tumoral (FNT- α), las interleuquinas (IL-1, IL-6 e IL-8) y el factor activador de plaquetas (FAP). Se desprende la CD14 unida a membrana, proporcionando CD14 soluble (=CD14_s) en respuesta a factores activadores o diferenciadores tales como IFN γ o FNT- α . La función fisiológica de CD14_s todavía no se conoce por completo. Debido a que operan procesos inflamatorios e inmunológicos en la AR y en
10 otras enfermedades autoinmunitarias, CD14_s también fue investigado en dichas enfermedades. Al evaluar la terapia anti-CD14 como nueva opción terapéutica en la AR, las concentraciones previamente elevadas de CD14_s se redujeron rápidamente y se redujo la sinovitis (Horneff G. *et al.*, Clin. Exp. Immunol. 91:207-213, 1993).

15 El glucosaminoglicano ácido hialurónico es una de las macromoléculas esenciales para el funcionamiento de las articulaciones. Es sintetizada por fibroblastos y otras células especializadas del tejido conectivo. El ácido hialurónico participa en la formación de la matriz extracelular y en los contactos célula-célula. Se observan concentraciones elevadas en el líquido sinovial, en el que es responsable de la retención de agua, contribuyendo de esta manera a la lubricación de las articulaciones. En la artritis reumatoide la síntesis del ácido hialurónico es estimulada por los mediadores proinflamatorios IL-1 y FNT- α , conduciendo a niveles séricos/plasmáticos incrementados (Sawai T. y Uzuki M., Connective Tissue 33:253-259, 2001).

20 Una característica de la artritis reumatoide es la invasión de las articulaciones por tejido sinovial proliferante, también conocido como pannus. Una parte significativa del pannus consiste de vasos sanguíneos que suministran nutrientes al tejido en crecimiento. Por lo tanto, las moléculas relevantes en la angiogénesis también han sido investigadas en la AR, tanto como marcadores de la AR como también como dianas terapéuticas (Brenchley P.E.C., Clin. Exp. Immunol. 121:426-429, 2000). Entre ellas se ha evaluado en mayor detalle el factor de crecimiento endotelial vascular (=FCEV). El FCEV es una glucoproteína secretada que se procesa en cuatro isoformas diferentes. Dos de estas isoformas son fácilmente difundibles, mientras que las isoformas restantes se unen estrechamente a la heparina y se observan más frecuentemente asociadas a proteoglicanos que contienen heparina. El FCEV actúa como una quimioquina sobre las células endoteliales, monocitos y osteoblastos, conduciendo finalmente a la neovascularización y a una permeabilidad microvascular incrementada. El FCEV ha sido detectado en el líquido sinovial y el suero de los pacientes de AR (Lee S.S. *et al.*, Clin. Exp. Rheumatology 19:321-324, 2001; Ballara S., Arthritis Rheum. 44:2055-2064, 2001). Preferentemente, el marcador de la angiogénesis es FCEV.

35 Los tejidos articulares más prominentes son el hueso, el cartílago y el sinovio. Debido a que la artritis reumatoide es una enfermedad destructiva, estos tejidos son los más afectados. Son una fuente probable de potenciales marcadores biológicos en el campo de la AR. En principio estos marcadores proceden no sólo de la destrucción del tejido respectivo sino también de un proceso de reparación desregulado y/o ineficaz. El experto en la materia entenderá que los marcadores del metabolismo de hueso, cartílago o sinovio pueden originarse de la síntesis o de la
40 destrucción de estos tejidos. Los diversos marcadores del metabolismo de hueso, cartílago y/o sinovio pueden definirse a partir de dos grupos diferentes de proteínas. Proceden de los numerosos tipos de colágeno o de proteínas no colágenas. Las proteínas no colágenas con frecuencia participan en la formación de la matriz extracelular. Algunos de estos marcadores pueden encontrarse en los tres tejidos en cantidades variables.

45 Entre los marcadores y productos del metabolismo de hueso y/o cartílago se incluyen tanto marcadores de la degradación de hueso y/o cartílago como marcadores de la formación de hueso y/o cartílago. Los marcadores preferentes derivados del metabolismo del colágeno son marcadores como:

50 1. Piridinolina (=PYD), desoxipiridinolina (=DPD) y Glc-Gal-PYD: La piridinolina (=PYD) estabiliza el colágeno entrecruzando las cadenas de la triple hélice del colágeno. La estructura química de la PYD es muy estable y puede encontrarse en suero y en la orina como producto final de la degradación del colágeno (Knott L. y Bailey A.J., Bone 22:181-187, 1998). Se asoció a la artritis (Kaufmann J. *et al.*, Rheumatology 42:314-320, 2003). La PYD sigue la participación del cartílago en la destrucción articular ya que es liberado del cartílago y sólo en cierto grado del hueso, mientras que su primo cercano la desoxipiridinolina (=DPD) se origina mayoritariamente de hueso. Los tres marcadores han sido asociados a artritis (Kaufmann, supra). La forma glucosilada Glc-Gal-PYD se ha observado más frecuentemente en el tejido sinovial (Gineyts E. *et al.*, Rheumatology 40:315-323, 2001).

60 2. Telopéptidos entrecruzados: CTX-1, CTX-II, NTX-1 y el epítipo LQ son telopéptidos entrecruzados del extremo C-terminal o N-terminal de los colágenos de tipo I o tipo II, respectivamente, y de entre los que β -CTX-I también es conocido como β CrossLaps® (Bond M. *et al.*, Clin. Chem. 40:2022-2025, 1994). El telopéptido carboxiterminal del colágeno de tipo I (=TPCI) se refiere a un fragmento y marcador de colágeno de tipo I que originalmente se ha derivado del colágeno de tipo I mediante corte con cianobromuro.

3. Péptidos lineales derivados del colágeno: el ensayo denominado Cartilaps® mide un péptido lineal que se deriva de la región C-terminal del colágeno de tipo II.

4. Aminoácidos modificados: el colágeno comprende aminoácidos modificados como la hidroxiprolina y la galactosil-hidroxilisina, los cuales pueden ser utilizados como marcador de la descomposición del colágeno (Al-Dehaimi A.W. *et al.*, Clin. Chem. 45:676-681, 1999).

5. Neoepítomos del colágeno: Col2-3/4 y CIIN son neoepítomos generados por el corte inicial del colágeno II por colagenasas (Billinghurst R.C. *et al.*, J. Clin. Invest. 99:1534-45, 1997).

6. Marcadores de colágeno que se considera reflejan la formación de hueso: Tanto el propéptido N-terminal como el propéptido C-terminal del colágeno de tipo I (=PCIN y PCIC), respectivamente, son recortados del polipéptido precursor (procolágeno) durante/después de la síntesis y se consideran marcadores de la formación de hueso. PCIIC es el propéptido correspondiente del colágeno de tipo II, mientras que PCIIN es el derivado del colágeno III.

Preferentemente el marcador del metabolismo de hueso y/o cartílago también puede ser un marcador no colágeno, tal como: CS846, que es un epítomo condroitín-sulfato creado durante la síntesis de agregano; la proteína de matriz oligomérica de cartílago (=PMOC) que presenta funciones de formación de puentes en el cartílago (Saxne T. y Heinegard D., Br. J. Rheumatol. 31:583-591, 1992); la proteína de capa intermedia del cartílago (=PCINC), que es una proteína de matriz del cartílago (Lorenzo P. *et al.*, J. Biol. Chem. 273:23463-23468, 1998); las proteínas de matriz 1-3 del cartílago, también conocidas como matrinas; las condromodulinas que actúan como moléculas de señalización en el cartílago (Suzuki F., Connect. Tissue Res. 35:303-307, 1996); la proteína sensible al ácido retinoico derivada del cartílago (=PARDC) o MIA, que presenta una función todavía desconocida en la modulación de los condrocitos (Müller-Ladner U., *et al.*, Rheumatology 38:148-154, 1999); la osteocalcina, que es sintetizada por los osteoblastos, pertenece a la proteína de matriz no colágeno mayor del hueso y se utiliza para el seguimiento de la renovación ósea (Gundberg C. M. *et al.*, J. Clin. Ligand Assay 21:128-138, 1998); y las sialoproteínas óseas, que son proteínas de matriz no colágenas mayores, tales como la sialoproteína ósea II, ahora conocida como sialoproteína ósea, que, por ejemplo, ha sido evaluada como marcador de la renovación ósea (Saxne T. *et al.*, Arthritis Rheum. 38:82-90, 1995).

Entre los productos del metabolismo dentro del sinovio que pueden utilizarse como marcador en la evaluación de la AR se incluyen: CTXIII, que es un telopéptido derivado del colágeno de tipo III; YKL40, que es una proteína similar a la quitinasa 3 de la matriz extracelular (Johansen J.S. *et al.*, Scand. J. Rheumatol. 30:297-304, 2001) y el agregano, que es un bloque constructivo de los proteoglicanos, así como su producto de degradación queratán sulfato.

Preferentemente el panel de marcadores de la AR comprende por lo menos tres marcadores, en el que se encuentran contenidos FR, IL-6 y un tercer marcador seleccionado de entre el grupo que consiste de CRP, AAS, S100, osteopontina, FR, pro-MPM-1, MPM-3, ácido hialurónico y un producto del metabolismo del colágeno.

En la evaluación de la RA resulta preferente un panel de marcadores que comprende FR, IL-6 y S100, especialmente S100A12.

También resulta preferente un panel de marcadores que comprende FR, IL-6 y pro-MPM-1.

Tal como se ha indicado anteriormente (ver los criterios de la ARA), a pesar de algunas limitaciones, el factor reumatoide (FR) actualmente es el único marcador bioquímico generalmente aceptado como ayuda en el establecimiento del diagnóstico de AR. Se espera claramente que la combinación de marcadores de la presente invención mejore significativamente el diagnóstico de la AR y complementará, o podría incluso sustituir finalmente, la evaluación química de la AR basada en un ensayo de FR únicamente. Por lo tanto, la utilización de un panel de marcadores que comprende por lo menos FR e interleuquina-6 en el diagnóstico de AR representa una realización preferente adicional de la presente invención.

Tal como apreciará el experto en la materia, puede utilizarse uno o más marcadores adicionales para mejorar adicionalmente la exactitud diagnóstica o, en caso necesario, incrementar la sensibilidad a expensas de la especificidad o viceversa. En algunas áreas diagnósticas, por ejemplo en la detección de una infección por VIH, la sensibilidad es de la máxima importancia. La elevada sensibilidad necesaria puede conseguirse a expensas de la especificidad, conduciendo a un número incrementado de casos falsos positivos. En otros casos, por ejemplo a título de ejemplo sencillo, al evaluar los antígenos de grupo sanguíneo, la especificidad es de la máxima importancia.

Un realización preferente adicional se refiere a la utilización de un panel de marcadores en el diagnóstico de la AR, comprendiendo el panel FR, interleuquina-6 y por lo menos un marcador adicional seleccionado de entre el grupo

que consiste de CRP, AAS, S100, osteopontina, FR, pro-MPM-1, MPM-3, ácido hialurónico, CD14_s, marcadores de angiogénesis y productos del metabolismo de hueso, cartílago o sinovio.

5 El método según la presente invención también resultará de gran utilidad en la evaluación de la gravedad de la AR. Cuanto más elevado el nivel de FR y/o el nivel de IL-6, más grave es la enfermedad. Con la combinación de marcadores o los paneles de marcadores actualmente disponibles, no resultará necesaria más que experimentación rutinaria para desarrollar, por ejemplo, puntuaciones de enfermedad a modo de indicadores de gravedad de la enfermedad. El método según la presente invención, de esta manera, preferentemente se utiliza también para evaluar la gravedad de la enfermedad.

10 El método de la presente invención también resultará de gran utilidad en el seguimiento del curso de la enfermedad. Lo anterior se lleva a cabo más fácilmente mediante la medición en una muestra del paciente de FR e IL-6, así como opcionalmente de marcadores adicionales en diversos puntos temporales y la comparación de los niveles absolutos y/o relativos de los marcadores en estos diferentes puntos temporales. De esta manera, resulta adicionalmente preferente utilizar el método según la presente invención para el seguimiento del curso de la enfermedad en un paciente con AR.

15 También se reconoce que la presente invención también resultará de gran utilidad en la evaluación de la eficacia de cualquier tratamiento para la AR. La eficacia del tratamiento se reflejará en cambios del nivel del marcador. En el caso de que el tratamiento presente el efecto deseado, se reducirá por lo menos uno de los niveles de los dos marcadores, FR o IL-6. El método según la presente invención, de esta manera, preferentemente se utiliza también para evaluar la eficacia del tratamiento. El mismo fenómeno, es decir, la reducción del nivel del marcador de por lo menos FR o IL-6, puede aplicarse fácilmente a la selección del fármaco correcto, así como la administración más apropiada de fármacos en la AR. La utilización de un método de la presente invención en la selección del fármaco correcto y/o de la dosis más apropiada también resulta preferente.

20 El método de la presente invención también permitirá la selección y la identificación de nuevos fármacos en el campo de la AR. Dicha aplicación representa una realización preferente adicional.

25 También resultará una gran ventaja que ahora puedan identificarse subgrupos de pacientes para y en estudios clínicos que difieren en su nivel de FR e IL-6 y correlacionar esta diferencia de nivel de marcador con la eficacia del fármaco bajo investigación.

35 Descripción de las figuras

La "puntuación de DR" en todas las figuras se refiere a la "puntuación de discriminante regularizado", es decir, la puntuación obtenida mediante la aplicación del análisis discriminante regularizado; "ABC" en todas las figuras representa el "área bajo la curva".

40 Figura 1 Análisis de COR de pacientes diagnosticados con AR frente a controles, incl. OA, utilizando log FR únicamente.

Figura 2 Análisis de COR de pacientes diagnosticados con AR frente a controles, incl. OA, utilizando la combinación de log FR total y log IL-6.

45 Figura 3 Análisis de COR de pacientes diagnosticados con AR frente a controles, incl. OA, utilizando la combinación de log FR total, log IL-6 y log pro-MPM-1.

50 Ejemplo 1

Población de estudio

Se recogieron muestras derivadas de 389 pacientes de AR altamente caracterizados con una duración máxima de la enfermedad de 15 años en cinco centros europeos con un seguimiento de dos años. Todos los individuos fueron diagnosticados como pacientes de AR según los criterios de la AR y presentaban un estado funcional \leq III según los criterios de clasificación de la ARA (Hochberg M.C. *et al.*, *Arthritis Rheum.* 35:498-502, 1992). Se documentaron todos los pacientes con un cuaderno de recogida de datos (=CRD) exhaustivo. El CRD incluía el cuestionario de evaluación de la salud, el cuestionario SF36, el recuento de articulaciones hinchadas y sensibles, la puntuación Larsen, parámetros de laboratorio, historia clínica de cirugía relevante, medicación, comorbilidades y medicación para comorbilidades. Se realizaron radiografías cada año siguiendo un procedimiento estandarizado. En el presente análisis sólo se incluyeron muestras de línea base obtenidas de los sujetos incluidos en el presente estudio.

También se recogieron muestras derivadas de 624 sujetos de control. De estos controles sólo se incluyeron los sujetos positivos para AR pero no otras formas de artritis. Se extrajeron 200 muestras de esta cohorte con edades correspondientes a las muestras de AR del estudio. Debido a que el estudio se centraba en discriminar la AR no sólo de los sujetos sanos sino también de otras enfermedades articulares, se añadieron 190 pacientes con OA tibiofemoral o patelofemoral de la rodilla a modo de controles de enfermedad. Para estos pacientes de OA se determinaron parámetros clínicos y de laboratorio y se calculó la puntuación radiográfica de Kellgren y Lawrence (Kellgren J.H. y Lawrence J.S., Ann. Rheum. Dis. 16:494-501, 1957).

Los datos demográficos para la población de estudio se proporcionan en la Tabla 1.

Tabla 1:

Grupos de pacientes			
Grupo	N	Edad	Género (f/m/?)
AR	389	59,1 (16-87)	256/132/1
Controles incl. OA	390	60,6 (38 -92)	195/195/0

Ejemplo 2

Marcadores medidos

La Tabla 2 presenta una selección de los ensayos utilizados y proporciona el formato de ensayo, así como los proveedores de los ensayos. La mayoría de los ensayos fueron de ELISA de formato de placa de microtitulación (=PMT) manual. Se determinó FR y CRP en un formato de ensayo homogéneo en un analizador automático Hitachi. Se determinaron las concentraciones de los marcadores en muestras de suero con dichos ensayos disponibles comercialmente para los pacientes así como para los controles.

Tabla 2:

Ensayos y proveedores		
Marcador biológico	Tipo/formato de ensayo	Proveedor
CRP	Homogenous assay, Hitachi	Roche Diagnostics, Mannheim (FRG)
Ácido hialurónico	Sandwich ELISA, MTP	Chugai, Tokyo (J)
IL-6	Sandwich ELISA, MTP	Roche Diagnostics, Mannheim (FRG)
Pro-MPM-1	Sandwich ELISA, MTP	The binding site, Birmingham (UK)
FR	Ensayo homogéneo, Hitachi	Roche Diagnostics, Mannheim (FRG)
AAS	ELISA tipo sándwich, MTP	Biosource, Nivelles (B)

Ejemplo 3

Evaluación estadística

Las cohortes de pacientes se dividieron aleatoriamente en un grupo de entrenamiento (aprox. 67%) y en un grupo de ensayo (aprox. 33%). Con el grupo de entrenamiento se desarrolló un algoritmo de clasificación y en el grupo de ensayo independiente se validó el algoritmo. Tal como puede observarse en la Tabla 3, los grupos respectivos presentaban tamaños y edades estrechamente correspondientes.

Tabla 3:

Distribución de edad de los grupos								
Grupo	estudio	N	media	Max	q3	mediana	q1	Min
Entrenamiento	AR	259	58,7	87	68	59	51	23
Entrenamiento	Controles incl. OA	261	60,2	92	69	60	51	42
Ensayo	AR	130	59,8	83	68	61	52	16
Ensayo	Controles incl. OA	129	61,3	84	70	63	52	38

Se generaron los algoritmos de clasificación mediante el análisis discriminante regularizado (ADR), que es una generalización del análisis discriminante común, es decir el análisis discriminante cuadrático y lineal (McLachlan G.J., Discriminant Analysis and Statistical Pattern Recognition, Wiley Series in probability and mathematical statistics, 1992). En el ADR se utilizaron alternativas a las estimaciones habituales de máxima probabilidad (de entrada) para las matrices de covarianza. Estas alternativas se caracterizan por dos parámetros (λ , γ), los valores de las cuales se ajustan a las situaciones individuales minimizando conjuntamente una estimación basada en las muestras del riesgo futuro de clasificación errónea (Friedman J. H., Regularized Discriminant Analysis, J. of the

American Statistical Association 84:165-175, 1989). A modo de método alternativo pueden ajustarse algoritmos de máquinas de soporte de vectores (Hastie, Trevor, Tibshirani, Robert, Friedman, Jerome, The Elements of Statistical Learning, Springer Series in Statistics, 2001) con resultados de clasificación comparables.

5 Los paneles de marcadores se construyeron por etapas partiendo del mejor marcador individual para el problema de clasificación y finalizando una vez el error total de clasificación ya no cambiaba de manera sustancial. Con el fin de obtener distribuciones centralizadas se transformaron todos los marcadores individuales utilizando la función logarítmica natural. Se utilizó una validación cruzada de 10 veces con el grupo de entrenamiento a fin de obtener estimaciones robustas del error total (sensibilidad, especificidad).
 10 Tras definir el panel de marcadores, se validó sin ningún ajuste adicional con un grupo de ensayo independiente.

Ejemplo 4

Identificación de un panel de marcadores para el diagnóstico de la AR

15 La Tabla 4 presenta los resultados de clasificación de los pacientes diagnosticados de AR frente a controles, incl. OA, con el grupo de entrenamiento. El primer marcador seleccionado fue RF; el segundo fue IL-6 y el tercero y último fue pro-MPM-1; después se detuvo el algoritmo. A modo de referencia se presentan los resultados de clasificación para FR total, que tal como se ha indicado anteriormente, actualmente es el único marcador bioquímico
 20 que forma parte de los criterios de la ARA.

El objetivo de la presente invención es mejorar el diagnóstico correcto de la AR frente a los controles, que incluyen la OA. El valor diagnóstico del panel de marcadores identificado se refleja mejor en la Tabla 4 mediante el error total de la clasificación. FR, actualmente el marcador biológico individual incluido en los criterios de la ARA, proporciona un error total de 0,184. La combinación preferente de FR e IL-6 mejora significativamente la clasificación, con un error total de 0,154. La adición de un tercer marcador finalmente ayuda a minimizar adicionalmente la clasificación errónea. El panel de marcadores de FR, IL-6 más pro-MPM-1 presenta un error total ligeramente inferior a 0,148.
 25

Tabla 4:

Resultados de clasificación con el grupo de entrenamiento de pacientes diagnosticados con AR frente a controles, incl. OA					
Nº de marcadores	marcador del panel de marcadores	Método (ADR)	Validación cruzada (10 veces)		
			ERROR TOTAL	Sensibilidad	Especificidad
1	log FR total	$\lambda = 0, \gamma = 0$	0,18	68,2%	95,6%
2	log FR total, log IL-6	$\lambda = 0, \gamma = 0,5$	0,15	74,6%	95,1%
3	log FR total, log IL-6, log pro-MPM-1	$\lambda = 0, \gamma = 0,25$	0,15	75,7%	95, 1%

30 Resulta crítica para el enfoque seleccionado en el presente estudio su aplicabilidad general. Para analizar esta cuestión, el panel de marcadores identificado en el grupo de entrenamiento se validó con un grupo de ensayo independiente. Tal como entenderá el experto en la materia, los resultados del grupo de entrenamiento y del grupo de ensayo pueden diferir ligeramente debido a que ambos grupos son verdaderamente independientes. La Tabla 5
 35 proporciona los resultados de clasificación con el mismo marcador individual FR o los paneles de marcadores mostrados en la Tabla 4. Tal como en el grupo de entrenamiento, la combinación de FR e IL-6, y opcionalmente con pro-MPM-1, reduce el error total de la clasificación. Los resultados presentados en las Tablas 4 y 5 muestran claramente que la combinación de FR, IL-6 y opcionalmente por lo menos un marcador adicional mejoran significativamente el diagnóstico de la AR, especialmente en comparación con FR total.
 40

Tabla 5:

Resultados de clasificación con el grupo de ensayo de pacientes diagnosticados con AR frente a controles, incluyendo pacientes con OA					
Nº de marcadores	marcador del panel de marcadores	Método (ADR)	Clasificación de grupo de ensayo		
			ERROR TOTAL	Sensibilidad	Especificidad
1	log FR total	$\lambda = 0, \gamma = 0$	0,19	66,9%	94,6%
2	log FR total, log IL-6	$\lambda = 0, \gamma = 0,5$	0,14	76,9%	95,3%
3	log FR total, log IL-6, log pro-MPM-1	$\lambda = 0, \gamma = 0,25$	0,14	77,7%	95,3%

Las curvas COR para los marcadores y combinaciones de marcadores, respectivamente, de la Tabla 5 se muestran en las figuras 1 a 3.

Lista de referencias

- Al-Dehaimi, A.W., *et al.*, Clin. Chem. 45 (1999) 676-681
- 5 Arnett, F. C., *et al.*, Arthritis Rheum. 31 (1988) 315-324
- Ballara, S., Arthritis Rheum. 44 (2001) 2055-2064
- Bartfeld, H., Ann. NY Acad. Sci. 168 (1969) 30-40
- Bas, S., *et al.*, Ann. Rheum. Dis. 61 (2002) 505-510
- Billinghurst, R. C., *et al.*, J. Clin. Invest. 99 (1997) 1534-45
- 10 Bonde, M., *et al.*, Clin. Chem. 40 (1994) 2022-2025
- Brenchley, P. E. C., Clin. Exp. Immunol. 121 (2000) 426-429
- Breiman, L., Friedman, J. H., Olshen, R. A. & Stone, C. J. (1984) Classification and regression trees, California: Wadsworth
- Breiman, L., Random Forests, Machine Learning, 45 (2001) 5-32
- 15 Burmeister, G., and Gallacchi, G., Inflammopharmacology 3 (1995) 221-230
- Chabas, D., *et al.*, Science 294 (2001) 1731-1735
- Chambers, R. E., *et al.*, Ann. Rheum. Dis. 42 (1983) 665-667
- Duda, R. O., Hart, P. E., Stork, D. G., Pattern Classification, Wiley Interscience, 2nd Edition (2001)
- Foell, D., *et al.*, Rheumatology 42 (2003) 1383-1389
- 20 Friedman, J. H., Regularized Discriminant Analysis, J. of the American Statistical Association, Vol. 84 (1989) 165-175
- Gineyts, E., *et al.*, Rheumatology 40 (2001) 315-323
- Gundberg, C. M., *et al.*, J. Clin. Ligand Assay 21 (1998) 128-138
- Hastie, Trevor, Tibshirani, Robert, Friedman, Jerome, The Elements of Statistical Learning, Springer Series in Statistics, 2001
- 25 Hochberg, M. C., *et al.*, Arthritis Rheum. 35 (1992) 498-502
- Horneff, G., *et al.*, Clin. Exp. Immunol. 91 (1993) 207-213
- Ishiguro, N., *et al.*, Arthritis Rheum. 44 (2001) 2503-2511
- Johansen, J. S., *et al.*, Scand. J. Rheumatol. 30 (2001) 297-304
- 30 Jorgensen, C., *et al.*, Clin. Exp. Rheum. 14 (1996) 301-304
- Kaufmann, J., *et al.*, Rheumatology 42 (2003) 314-320
- Kellgren, J. H., and Lawrence, J. S., Ann. Rheum. Dis. 16 (1957) 494-502
- Knott, L., and Bailey, A. J., Bone 22 (1998) 181-187
- Lee, S. S., *et al.*, Clin. Exp. Rheumatology 19 (2001) 321-324
- 35 Lorenzo, P., *et al.*, J. Biol. Chem. 273 (1998) 23463-23468
- McLachlan, G. J., Discriminant Analysis and Statistical Pattern Recognition, Wiley Series in probability and mathematical statistics, 1992
- Methods in Enzymology, eds. S.P. Colowick, N.O. Caplan and S.P., Academic Press, dealing with immunological detection methods, various volumes especially volumes 70, 73, 74, 84, 92 and 121.
- 40 Moore, T. L., and Dorner, R. N., Clin Biochem. 26 (1993) 75-84
- Mozes, G. *et al.*, J. Trauma 29 (1989) 71-74
- Müller-Ladner, U., *et al.*, Rheumatology 38 (1999) 148-154
- Pepe, M. S., The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction, Oxford Statistical Science Series, 28 (2003)
- 45 Petrow, P. K., *et al.*, Arthritis Rheum. 43 (2000) 1597-1605
- Ruczinski, I., Kooperberg, C., LeBlanc, M., Logic regression, J. of Computational and Graphical Statistics, 12 (2003) 475-511
- Sawai, T., and Uzuki, M., Connective Tissue 33 (2001) 253-259
- Saxne, T., and Heinegard, D., Br. J. Rheumatol. 31 (1992) 583-591
- 50 Saxne, T., *et al.*, Arthritis Rheum. 38 (1995) 82-90
- Suzuki, F., Connect. Tissue Res. 35 (1996) 303-307
- Swedler, W., *et al.*, J. Rheumatol 24 (1997) 1037-1044
- Tijssen, P., In: Practice and theory of enzyme immunoassays, eds. R. H. Burdon and v.P.H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam (1990) 221-278
- 55 Van der Heijde, D. M., Br J. Rheumatol. 34 (1995) 74-78
- Waalder, E., Acta Pathol. Microbiol. Scand. 17 (1940) 172-188
- Zweig, M. H., and Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para evaluar la ausencia o la presencia de artritis reumatoide *in vitro* con marcadores bioquímicos, que comprende medir en una muestra la concentración de por lo menos:
- a) FR e
 - b) interleuquina-6,
 - 10 c) combinando matemáticamente los valores medidos de FR e IL-6 utilizando análisis discriminante, métodos núcleo, métodos no paramétricos, cuadrados mínimos parciales, métodos basados en árboles, modelos lineales generalizados, métodos basados en componentes principales, modelos aditivos generalizados, métodos basados en lógica difusa, o métodos basados en redes neuronales o en algoritmos genéticos, y
 - d) correlacionar el valor combinado de (c) con la ausencia o la presencia de la artritis reumatoide.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, que comprende además la medición de por lo menos un marcador adicional seleccionado de entre el grupo que consiste de CRP, AAS, S100, osteopontina, pro-MPM-1, MPM-3, ácido hialurónico, CD14_s, marcadores de angiogénesis y productos del metabolismo de hueso, cartílago o sinovio.
- 20 3. Método según la reivindicación 2, en el que dicho marcador adicional es el marcador pro-MPM-1.
- 25 4. Utilización de un valor corte multivariante optimizado para un panel de marcadores que comprende por lo menos FR e interleuquina-6 en el diagnóstico de la ARN, en la que dicho valor de corte multivariante optimizado se obtiene combinando matemáticamente los valores medidos de FR e IL-6 utilizando análisis discriminante, métodos núcleo, métodos no paramétricos, cuadrados mínimos parciales, métodos basados en árboles, modelos lineales generalizados, métodos basados en componentes principales, modelos aditivos generalizados, métodos basados en lógica difusa, o métodos basados en redes neuronales o en algoritmos genéticos.
- 30 5. Utilización según la reivindicación 4, que comprende FR, interleuquina-6 y por lo menos un marcador adicional seleccionado de entre el grupo que consiste de CRP, AAS, S100, osteopontina, pro-MPM-1, MPM-3, ácido hialurónico, CD14_s, marcadores de angiogénesis y productos del metabolismo de hueso, cartílago o sinovio.

Fig. 1

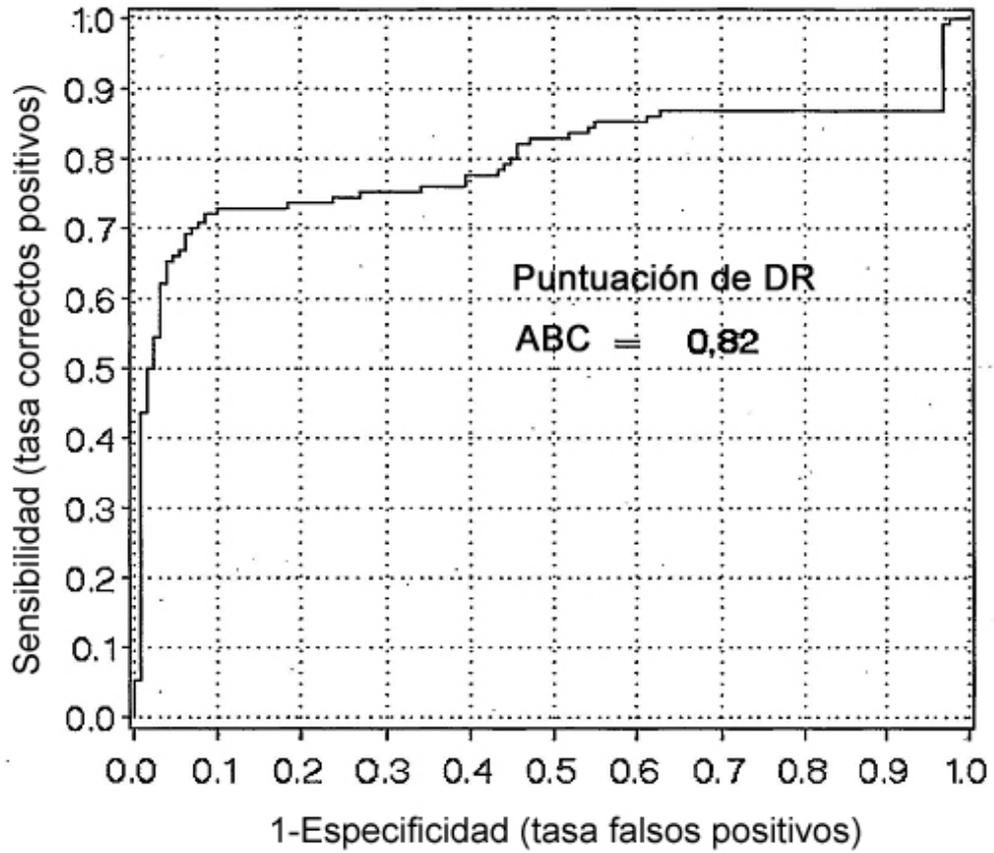


Fig. 2

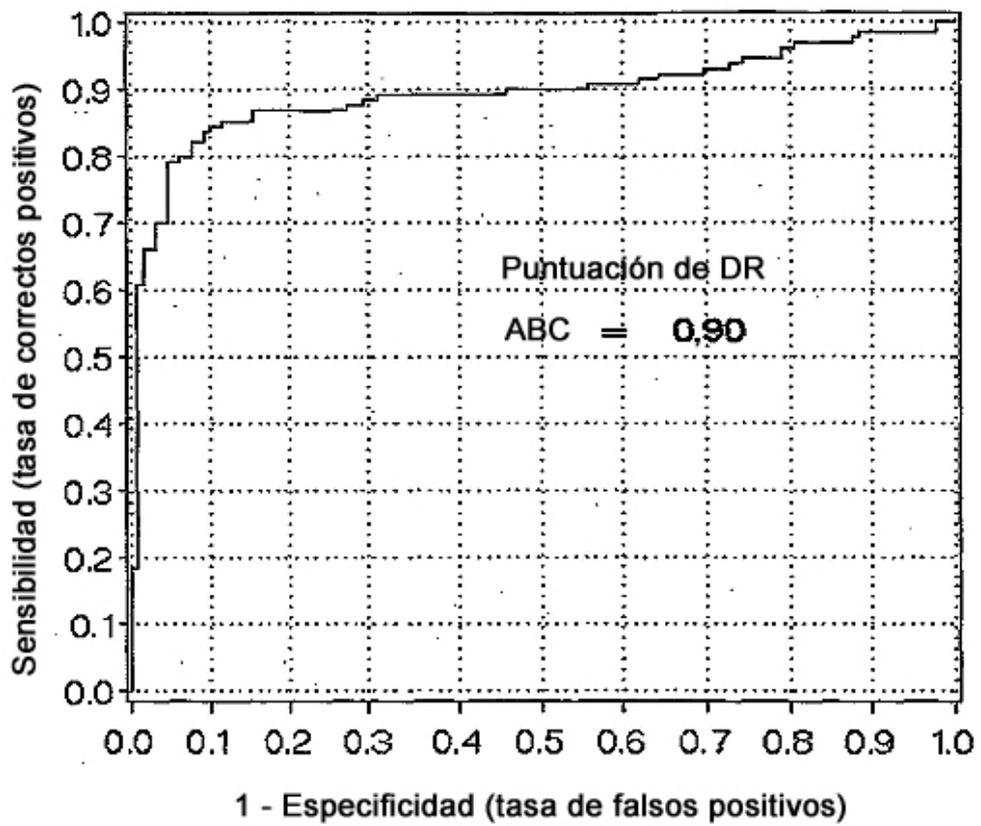


Fig. 3

