

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 836**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2008 E 13181096 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 2666874**

54 Título: **Composiciones y métodos para diagnosticar y evaluar miopatías inflamatorias**

30 Prioridad:

12.07.2007 US 929775 P

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

12.08.2015

73 Titular/es:

**THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
(100.0%)
75 Francis Street
Boston, MA 02115, US**

72 Inventor/es:

GREENBERG, STEVEN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 542 836 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

Composiciones y métodos para diagnosticar y evaluar miopatías inflamatorias

Campo de la invención

5 La invención se encuentra en el campo de métodos que pueden emplearse para determinar si un sujeto manifiesta un perfil de expresión de genes característico de miopatías inflamatorias.

Antecedentes de la invención

10 Las miopatías inflamatorias constituyen un grupo de enfermedades que llevan consigo inflamación de músculos o de tejidos asociados y que se caracterizan principalmente por debilidad, atrofia muscular y, con frecuencia, dolor. Los tres subtipos principales de miopatías inflamatorias son la dermatomiositis (DM), la polimiositis (PM), y la miositis de inclusión corporal (IBM). La PM y la DM son similares clínicamente excepto que la DM va asociada con erupciones de la piel mientras que la PM no lo es. Aun cuando la DM ha sido caracterizada como una enfermedad ocasionada por el ataque de anticuerpos de antígenos endoteliales (Dalakas, et al., *Lancet*, 362(938):971-82 (2003)), no han sido identificados anticuerpos patógenos ni antígenos endoteliales bien caracterizados (Greenberg, et al., *Curr. Opin. Neurol.* 17(3):359-64 (2004)).

15 La IBM se ha diagnosticado equivocadamente con frecuencia como PM, pero, a diferencia de PM o DM, no responde típicamente al tratamiento con fármacos inmunosupresores. La diagnosis de IBM; se basa habitualmente en resultados de biopsias que ponen de manifiesto células musculares con cuerpos de inclusión, es decir, con vacuolas que contienen una proteína amiloide. En la actualidad no hay tratamiento eficaz de la IBM pero los pacientes pueden frecuentemente beneficiarse de la administración de prednisona o de una inmunoglobulina intravenosa (IVIG).

20 La determinación del perfil de expresión de genes de los músculos en DM de adultos comparado con otras miopatías inflamatorias y con controles de salud normales, ha revelado una señal de transcripción génica que está dominada por la regulación por aumento de genes inducibles por interferón- α/β (IFN- α/β), Greenberg, et al., *Ann. Neurol.* 57(5):664-78 (2005). La caracterización adicional de células dendríticas plasmacíticas (PDCs), células que producen IFN- α/β natural, está presentes en los músculos de DM. La proteína inducida por interferón- α/β , MxA, se expresa en miofibras perifasciculares y capilares- Estas observaciones sugieren que el daño en tejidos en DM deriva de una activación autodestructiva del sistema inmunitario innato (Greenberf, et al., *Ann. Neurol.* 57(5):664-78 (2005)). Una caracterización posterior de tipos de expresión de genes en DM, PM e IBM puede conducir a métodos mejores para distinguir las miopatías inflamatorias una de otra y de otras enfermedades caracterizadas por debilidad muscular progresiva.

Compendio de la invención

35 La presente invención se basa en la medida cuantitativa de transcritos de RNA en la sangre producidos por el gen RSAD2. Un nivel alto de este transcrito tiene un valor que puede predecirse positivo alto para una diagnosis de dermatomiositis o polimiositis, y excluye la diagnosis de la miositis de inclusión corporal (IBM).de miopatías inflamatorias afines. Niveles elevados de transcritos de este gen no se observan en otras condiciones musculares, tales como distrofia muscular o miastenia grave, que pueden ser importantes para la diferenciación diagnóstica.

40 En su primer aspecto, la invención se dirige a un método para determinar si un sujeto pone de manifiesto un tipo de expresión génica característico de polimiositis o dermatomiositis, y no característico de miositis de inclusión corporal (IBM) que comprende:(a) ensayar una muestra biológica de prueba de células mononucleares de sangre periférica para determinar la expresión del dominio del radical S-adenosilo génico/CIG5 (RSAD2); y (b) llegar a la conclusión de que dicho sujeto posee un perfil de expresión génica que es característico de dermatomiositis o polimiositis, y que no es característico de IBM, si los resultados determinados en el ensayo indican que el gen RSAD2 está expresado en una cantidad al menos 10 veces mayor en dicha muestra de prueba que en una o más muestras de control.

45 Preferiblemente el método comprende, además, ensayar la muestra de prueba para determinar la expresión de uno o más genes adicionales seleccionados del grupo que consiste en proteína 27 inducible por interferón alfa; proteína 44 similar inducida por interferón; proteína 44 inducida por interferón; proteína hipotética LOC129607; 2',5'-oligoadenilato sintetasa 1; factor 1 asociado a XIAP; tetratricopéptido 5 inducido por interferón; 2',5'-oligoadenilato sintetasa similar; 2',5'-oligoadenilato sintetasa 3; tetratricopéptido 1 inducido por interferón; escramblase 1 de fosfolípido; dominio hect y RLD 5; proteína quinasa inducible por interferón; miembro 10 de superfamilia de TNF; proteína 1 de unión a guanilato; proteína 6 inducida por TNF alfa; tetratricopéptido 3 inducido por interferón; dominio 9 similar de motivo alfa estéril; proteína 5 que modifica cromatina; modificador similar a ubiquitina ISG15; 2',5'-oligoadenilato sintetasa 2; dominio 1 de helicasa C inducido por interferón; resistencia 1 de mixovirus; y gen 1 de interacción estromal epitelial. Los nombres de los genes, las abreviaturas de cada uno y los números de los catálogos de secuencias de las bases de datos de UniGene y GenBank se proporcionan en la Tabla 4.

55 Para los fines de la presente invención, los ensayos para determinar el nivel de expresión de un gen pueden dirigirse o bien a ácidos nucleicos (p.ej., utilizando la amplificación por PCR de mRNA) o bien a productos génicos (p.ej.

utilizando un método ELISA o un radioinmunoensayo). Los resultados obtenidos utilizando la muestra de prueba se comparan con los resultados que proceden de una o más muestras control seleccionadas empleando criterios bien conocidos en la técnica. Las muestras control pueden ser, por ejemplo, muestras de sangre, suero o plasma procedentes de individuos que se sabe que están libres de una miopatía inflamatoria o de otras enfermedades musculares, o pueden tomarse de la población como un todo y, opcionalmente, equilibrarse con la muestra de prueba en lo que respecta a la edad del sujeto, el sexo, etc. Comparando los resultados de los controles y de la muestra de prueba, puede llegarse a la conclusión con respecto a si el sujeto padece una miopatía inflamatoria y, si está presente, el tipo particular de miopatía inflamatoria. Las diferencias que manifiestan la mayoría de los genes y cuanto mayor es la magnitud de las diferencias, mayor es el riesgo de que un sujeto sea positivo para la enfermedad. Preferiblemente los ensayos se llevarán a cabo sobre al menos 5 genes y, más preferiblemente, al menos 15 genes. Un aumento de al menos 10 veces en muestras que proceden de sujetos, comparadas con las de los controles, se observará generalmente en pacientes con una miopatía inflamatoria con aumentos superiores (20 a 50 veces) siendo más característico de DM o PM. Los genes más preferidos indicados en la Tabla 2 son los que manifiestan la máxima diferencia en el nivel de expresión en individuos aquejados de enfermedad con relación a los controles.

En una realización preferida, el método de la invención se lleva a cabo empleando una placa de microarray o una diapositiva que tienen una serie de oligonucleótidos inmovilizados, diferentes, que reconocen las secuencias de los genes indicadas anteriormente. El término "diferente" indica que los oligonucleótidos tienen secuencias diferentes que les permiten hibridarse con diferentes secuencias complementarias. Se conocen muchos métodos en la técnica para producir placas o diapositivas de esta naturaleza y cualquiera de estos métodos son compatibles con la presente invención. Las placas o diapositivas deben incluir oligonucleótidos inmovilizados que se hibridan en condiciones restrictivas con al menos uno de los genes anteriormente expuestos, y, preferiblemente, las diapositivas incluyen varios oligonucleótidos diferentes que se fijan a genes diferentes. La expresión "condiciones restrictivas" indica condiciones que esencialmente solo permiten que ocurra hibridación con la secuencia complementaria exacta del oligonucleótido inmovilizado. En general, estas hibridaciones se llevan a cabo en el seno de tampones de pH aproximadamente neutro que contienen 0,1-0,5 de NaCl y a una temperatura de entre 45 y 70°C. También es posible realizar incubaciones en condiciones restrictivas bajas y después utilizar condiciones de lavado de alta restrictividad para ocasionar la disociación de secuencias hibridadas que no están apareadas. Los procedimientos operatorios para realizar incubaciones de este tipo en relación con placas de microarray o diapositivas están bien conocidos en la técnica.

Cada grupo de oligonucleótidos inmovilizados que se hibridan con un gen específico puede ocupar una posición separada sobre la placa de microarray o diapositiva y en total, habría no más de 100 oligonucleótidos diferentes presentes. En realizaciones preferidas, hay al menos 10 oligonucleótidos diferentes inmovilizados en placas que se hibridan en condiciones restrictivas con genes diferentes prefiriéndose al menos 15 de tales oligonucleótidos inmovilizados. Por razones económicas, se prefiere también que el número total de secuencias inmovilizadas presente sea 100 o menos, más preferiblemente 50 o menos.

Las placas de microarray descritas se emplean preferiblemente para llevar a cabo cualquiera de los métodos de ensayo de muestras descritos en la presente memoria. Un modo de realización de un análisis llevaría consigo lisar células y amplificar luego el mRNA liberado en presencia de un marcador detectable, p.ej. un nucleótido fijado a un colorante u otro marcador y presente en un cebador de PCR. Así pues, se obtiene una población de cDNAs marcados que puede emplearse directamente en hibridaciones con oligonucleótidos inmovilizados en una placa de microarray o diapositiva. También es posible comparar dos poblaciones diferentes de mRNAs llevando a cabo PCR en presencia de colorantes diferentes para cada población. Una vez completadas las hibridaciones, las placas se analizan utilizando un lector automatizado para determinar la cantidad de marcador asociado con cada una de las secuencias inmovilizada, lo que refleja la abundancia de la secuencia hibridada existente en el lisado original. Muchas variaciones de este procedimiento operatorio básico han sido descritas en la técnica y son compatibles con la presente invención.

Descripción detallada de la invención

I. Preparación de muestras de empleo en hibridaciones

Pueden obtenerse muestras que contienen células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), lisarse y extraerse para obtener RNA utilizando procedimientos operatorios descritos en la presente memoria y que son normas en la técnica. Los ensayos pueden llevarse a cabo utilizando procedimientos operatorios normales descritos por los fabricantes de placas de microarray y, en general, según ha descrito previamente Greenberg, et al., *Neurology* 59(8):1170-82 (2002). Alternativamente, puede obtenerse mRNA de células musculares conseguidas durante biopsias y analizarse.

II. Materiales de microarray y ensayos

Todos los genes identificados en la presente memoria como alterados en pacientes con polimiositis o dermatomiositis estaban presentes en las placas Affymetrix descritas en la sección de Ejemplos. En principio, las mismas placas podrían emplearse para evaluar el mRNA procedente de PBMCs o de células musculares. Sin

embargo, dado que las placas empleadas incluyen oligonucleótidos inmovilizados para miles de genes diferentes, el sistema es inconveniente e innecesariamente costoso. Las placas mejor adecuadas para el análisis descrito en la presente memoria pueden obtenerse concentrándose sobre los genes indicados en la Tabla 2. Por tanto, pueden emplearse placas similares a las placas Affymetrix, en las mismas condiciones de ensayo, pero solamente con un pequeño número de sitios de hibridación diferentes (p.ej., 5-50 ó 5-100). Esto simplifica el análisis y permite incluir muestras replicadas para comprobar de mejor modo la consistencia de los resultados.

Aun cuando los mismos procedimientos operatorios y soporte fijados (hardware) descritos por Affymetrix podrían emplearse en conexión con la presente invención, también se encuentran disponibles otras alternativas. Se han descrito muchos informes que detallan métodos para realizar microarrays y para llevar a cabo ensayos (véanse, p.ej., Bowtell, *Nature Genetics Suppl.* 21:25-32 (1999); Constantine, et al., *Life Sci, News* 1:11-13 (1998); Ramsay, *Nature Biotechnol.* 1640-44 (1998)). Adicionalmente, se han expedido patentes que describen técnicas para producir placas de microarray, diapositivas e instrumentos afines (documentos U.S. 6.902.702; U.S. 6.594.432; U.S. 5.622.826) y para realizar ensayos (U.S. 6.902.900; U.S. 6.759.197). Las dos técnicas principales para obtener placas o diapositivas llevan consigo o bien métodos polilitográficos (véanse los documentos U.S. 5.445.934 y U.S. 5.744.305) o métodos robóticos de obtención de manchas (U.S. 5.807.522). Otros procedimientos operatorios pueden llevar consigo impresión con chorro de tinta u obtención de manchas de capilares (véanse, p.ej los documentos WO 98/29736 o WO 00/01859).

El sustrato utilizado para placas de microarray o diapositivas puede ser cualquier material capaz de enlazarse e inmovilizar oligonucleótidos incluyendo plástico, metales tales como platino y vidrio. Un sustrato preferido es vidrio revestido con un material que favorece que los oligonucleótidos se enlacen tales como polilisina (véase, Chena et al., *Science* 270:467-470 (1995)). Se han descrito muchos esquemas para enlazar covalentemente oligonucleótidos y que son adecuados para emplear en relación con el método de la presente invención (véase, p.ej., el documento U.S. 6.594.432). Los oligonucleótidos inmovilizados deben tener, como mínimo, una longitud de 20 bases y han de poseer una secuencia que se corresponda exactamente con un segmento del gen considerado diana de hibridación.

III. Comentarios con respecto a la metodología adicional

Aun cuando pueden utilizarse los métodos descritos anteriormente para determinar el nivel de expresión génica en PBMCs, puede utilizarse cualquier otro procedimiento operatorio para realizar este análisis en relación con la invención. Por ejemplo, pueden utilizarse técnicas de transferencia de DNA, con o sin amplificación de PCR, para detectar cuantitativamente los niveles de genes.. Pueden utilizarse transferencias Western o inmunoensayos para cuantificar los productos génicos y, en algunos casos, pueden utilizarse ensayos a base de enzimas. El nivel de expresión puede valorarse también mediante técnicas de inmunofluorescencia o ensayos de información a base de un promotor. El elemento esencial del procedimiento operatorio no es como se lleva a cabo la cuantificación, sino más bien los genes particulares que se están examinando y la determinación de si esos genes se están expresando en un nivel característico de la presencia o estado de PM o DM, y no característico de IBM;.

V. Comentarios con respecto a utilidad

Los ensayos descritos en la presente memoria están diseñados para valorar si loa PBMCs tienen un perfil de expresión génica característico de polimiositis o dermatomiositis, y no característico de miositis de inclusión corporal. Esto tiene con claridad gran valor para los científicos que estudian estas enfermedades, y para los clínicos que intentan llevar a cabo una diagnosis o determinar si un régimen de tratamiento o un fármaco ejerce un efecto beneficioso.

Ejemplos

Se emplearon microarrays de genomas totales Affymetrix para medir la expresión de aproximadamente 38.500 genes de 65 muestras de sangre y 15 muestras musculares procedentes de 56 sujetos con dermatomiositis, polimiositis, miositis de inclusión corporal, miastenia grave, distrofia muscular y voluntarios sanos. Además, se compararon nueve muestras de sangre apareadas procedentes de los mismos individuos tomadas en tiempos diferentes con actividad de enfermedad diferente. Se utilizaron técnicas bioinformáticas para identificar genes con expresión génica diferente importante entre categorías de diagnóstico y con respecto a la actividad de la enfermedad. Los datos obtenidos de los microarrays se corroboraron con PCR cuantitativa en tiempo real.

Se descubrió que la mayoría de los pacientes con dermatomiositis y polimiositis activas, pero no pacientes con miositis corporal de inclusión, tienen una regulación por aumento en la sangre, importante y alta, de genes inducibles por interferón- α/β del tipo 1. Además, la regulación por aumento de esos genes se correlaciona con la actividad de la enfermedad en dermatomiositis y polimiositis, con regulación por disminución que ocurre cuando la enfermedad se controla con tratamiento.

Materiales y métodos:

Sujetos de estudio

Se realizaron 65 experimentos de microarray sobre muestras de sangre procedentes de un total de 56 sujetos inscritos de modo prospectivo de los cuales 36 padecían miopatías inflamatorias (12 con DM, 11 con PM, y 13 con IBM). Para grupos de control adicionales, se estudiaron cinco pacientes con miastenia grave, una miopatía autoinmunitaria no inflamatoria, tres pacientes con miopatías determinadas genéticamente (dos con distrofia miotónica de tipo 2 y uno con miopatía mitocondrial), y 12 voluntarios sujetos sanos. Seis pacientes con DM y dos con PM proporcionaron segundas muestras de sangre para experimentos de microarray llevados a cabo en dos puntos de tiempo diferentes, uno en el que había enfermedad activa, y el otro cuando la enfermedad había mejorado; un paciente con DM refractaria proporcionó dos muestras en puntos de tiempo diferentes, ambos cuando había enfermedad activa. Todos los pacientes examinados mostraron criterios de investigación de DM o PM definida o probable (Hoogendijk, et al., *Neuromuscul. Disord.* 14(5):337-45 (2004)), e IBM definida o posible (Griggs, et al., *Ann. Neurol.* 38(5):705-13 (1995)). Se excluyeron pacientes con lupus eritematoso sistémico. Las características de los pacientes con DM (edad media 47 años) y PM (edad media 54 años) están expuestas en la Tabla 1. Seis pacientes, dos con DM y cuatro con PM, tenían una enfermedad pulmonar intersticial. De esos, los dos pacientes de DM y uno de los pacientes de PM, tenían adicionalmente anticuerpos de RNA de transferencia anti-histidilo (anti-Jo-1). Los pacientes con IBM, cinco hombres y siete mujeres, tenían una edad media de 69 años, y ninguno recibía medicación inmunomoduladora. Los voluntarios sanos, en el momento del reclutamiento, no tenían ni habían tenido patologías graves en los últimos seis meses, no habían empezado algunas medicaciones nuevas en los últimos seis meses y no tenían enfriamiento, gripe importante u otras infecciones en los dos meses anteriores. Los voluntarios se componían de cinco hombres y siete mujeres y tenían una edad media de 46 (intervalo 30-62). Un Internal Review Board aprobó el estudio. Se obtuvo un acuerdo informado escrito de todos los pacientes y voluntarios sanos que participaron.

Valoración de actividad de enfermedad

Se clasificaron los pacientes de DM y PM como aquellos con enfermedad activa (DMA; PMA) y aquellos con enfermedad que mejoraba (DMI; PMI). Los pacientes que tenían 3 de los 4 casos siguientes fueron clasificados como activos: (1) síntomas crecientes, (2) debilidad objetiva creciente en el ensayo de musculatura manual, (3) elevada y, si más de una medida disponible, un nivel creciente de creatina quinasa (CK) sérica y (4) el facultativo de tratamiento había aumentado la inmunoterapia del paciente. Características similares han sido empleadas previamente para definir la enfermedad activa en miositis (Nagy, et al., *Immunol. Lett.* 74(3):207-10 (2000)). Los pacientes de DM y PM se clasificaron como activos o en mejoría en expectativa, antes del análisis de los datos de la expresión génica. Se empleó el ensayo de musculatura manual utilizando la calificación MRC, para valorar la resistencia; se calculó una puntuación compuesta para 30 grupos musculares diferentes, que daban una puntuación máxima de 150. Se empleó la Intención de Miositis para tratar el Índice de Actividad (MITAX) (Isenberg, et al., *Rheumatology (Oxford)* 43(1):49-54 (2004)), propuesto por el grupo International Myositis Assessment and Clinical Studies como una medida adicional de la actividad de la enfermedad. El MITAX es una herramienta de valoración de multisistemas que contempla los sistemas musculares, mucocutáneos, gastrointestinales, respiratorios y musculoesqueléticos. Una buena fiabilidad entre ellos ha sido informada para esta medida de actividad de una enfermedad. En los nueve pacientes con muestras apareadas se apreció una reducción media de la puntuación de MITAX de 8,5 entre activos y en mejoría. Las puntuaciones de actividad variaron de 12-13 y las puntuaciones de mejoría variaron de 2-6.

Colección de PBMC, colección de tejido muscular, y extracción de RNA.

Se recogieron 10 ml de sangre de pacientes y voluntarios en tubos que contenían EDTA (57 muestras), o en algunos casos directamente en tubos PAX-Gene-RNA (8 muestras). Para los tubos que contenían EDTA, después de centrifugación, se aspiró el plasma (capa superior) hasta 1 mm desde las células de glóbulos rojos, y después cuidadosamente se aspiraron 500 µl de capa anteaada en Cryostat Storage Tubes, ya llenos con 1,2 ml de solución de RNAlater (Ambion, Austin, Texas). Se congeló la capa anteaada reunida y RNAlater a -20°C. Se extrajo el RNA empleando "Ribo Pure" (Ambion, Austin, Texas) desde la capa anteaada y de los tubos de PAX-Gene RNA. La concentración de RNA se midió empleando un espectrofotómetro, y la calidad de RNA se evaluó haciendo correr 1 µg de RNA sobre geles de agarosa al 1%. Las muestras de biopsias musculares de peso 70 a 120 mg tenían RNA extraído como se ha descrito previamente (Greenberg, et al., *Neurology* 59(8):1170-82 (2002)). Se obtuvo tejido de las biopsias musculares de 15 pacientes (5 DM, 5 PM, y 5 IBM) en el tiempo de enfermedad activa, todos los cuales disponían también de estudios en microarray de sangre en puntos de tiempo activos o en mejoría, y de 5 pacientes sin enfermedad neuromuscular que experimentara biopsias de diagnóstico. La extracción de RNA muscular se realizó con RiboPure de modo similar a la extracción de RNA de PBMC. De esos 15 estudios con microarray de músculos con miopatía inflamatoria, 9 (3 con DM, 2 con PM, y 4 con IBM) habían sido realizados previamente con partes de los datos empleados en publicación, y habían sido reanalizados en este estudio, y 6 fueron nuevamente realizados específicamente para estos estudios.

Preparación diana, hibridación y detección de señales

Se llevaron a cabo estudios de microarray de músculos como se ha descrito previamente, utilizando microarrays de Affymetrix HG-U133A (Greenberg, et al., *Neurology* 59(8):1170-82 (2002)). Las muestras de PBMC fueron tratadas empleando Affymetrix HG-U133A más 2,0 microarrays y GeneChip Operating System (GCOSv1,3) versión i.3.

5 Procesamiento de datos

El Affymetrix HG-U133 más 2.0 Gene Chip tiene 54.675 conjuntos de sondas que incluían 63 conjuntos de sondas de control. Se obtuvieron anotaciones de conjuntos de sondas de NetAffx Analysis Center, versión 3/9/2007. Los niveles de expresión se calcularon empleando el Análisis Multichip Robusto de contenido de GC (GCRMA), que se implementó en el paquete del Bioconductor *GCRMA* (del que puede disponerse con el algoritmo <http://www.bioconductor.org/download/oldrelease/bioc1.6/popular/gcrma.html>). Este algoritmo produce una medida de expresión mejorada teniendo en cuenta el bias basado en el contenido de GC y el comportamiento del ruido óptico procedente de todos los arrays de un experimento (Wu, et al., *J. Comput. Biol.* 12(6):882-93 (2005)). El control de calidad se realizó mediante inspección visual de imágenes escaneadas y reconstruidas para identificar formaciones groseras y por evaluación cuidadosa de los parámetros de valoración de la calidad con inclusión de conjuntos de sondas de control. Todos los datos obtenidos de microarrays musculares se analizaron conjuntamente con GCRMA en este estudio.

Análisis y visualización de datos

Se calcularon la media e intervalos de confianza (CIs) de 90% de cambios de pliegues para cada grupo de enfermedad en comparación con grupo control además del valor p de dos comparaciones de grupos utilizando el ensayo de Welch (Tabla 2). Se aplicaron criterios restrictivos para seleccionar genes como regulados por aumento significativamente, que requerían un valor p < 0,0001, y la unión más baja de CIs > 4,0. Los genes fueron identificados como inducidos por IFN- α/β mediante búsquedas de bibliografía (10-12) y bases de datos moleculares.

Los cambios de pliegues de grupos y CIs se calcularon comparando 8 DMA, 11 DMI, 7 PMA, 6 PMI, 13 IBM, 5 MG, 3 miopatías determinadas genéticamente, y 12 muestras de sangre normal. Adicionalmente, 9 pacientes (7 con DM, 2 con PM) con muestras apareadas (18 muestras) fueron analizados por parejas para cambios asociados al tratamiento en señales génicas. Los datos obtenidos de expresión en sangre y músculos se compararon con 13.398 genes comunes a ambos HG-U133A y HG-U133A más 2,0 chips de microarray, con mapas establecidos según identificaciones de conjuntos de sondas Affymetrix.

Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Se llevó a cabo PCR cuantitativa en tiempo real para dos genes inducibles por IFN: IFIT1 y MX1 sobre 18 muestras (4 DMA, 5 DMI, 4 IBM, y 5 voluntarios sanos) empleando cebadores diseñados con soporte lógico Primer (Whitehead Institute, Cambridge, MA) y adquiridos comercialmente (Operon Biotechnologies, Inc. Huntsville, AL). Los cebadores empleados fueron los siguientes: MxA: 5'-CGGCTAACGGATAAGCAGAG-3' directo (SEQ ID NO: 1), y 5'-ACCTACAGCTGGCTCCTGAA-3' inverso (SEQ ID NO:2; IFIT1: 5'-AAAAGCCCACATTTGAGGTG-3' directo (SEQ ID NO:3), y 5'-GAAATTCCTGAAACCGACCA-3' jnverso (SEQ ID NO:4)

RNA (1 μ g) se transcribió inverso a cDNA con oligo(dT)₂₀ y el kit de transcripción inversa Ready-to-Go de (Amersham Biosciences, Piscataway, Nueva Jersey). Se llevó a cabo PCR en tiempo real basado en SYBR Green I sobre Opticon Monitor (MJ Research, Inc, Waltham, MA) con moldes de cDNA (1/100 de la reacción RT) empleando Promega (Madison, WI) taq polimerasa y tampón, MgCl₂ 2 mM, deoxi-NTP 400 mM (Roche), SYBR Green I 0,5X, 0,8 mM de cada cebador de PCR (Operon) en un volumen final de reacción de 25 ml. Las muestras se cargaron en pocillos de microplacas de 96 pocillos de Low Profile. Después de una etapa inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, las condiciones de ciclación fueron 40 ciclos de desnaturalización (95°C durante 30 s), hibridación de extremos complementarios (durante 30 s) y extensión (72°C durante 1 minuto). La señal de fluorescencia se midió inmediatamente después de incubación a 79°C durante 5 segundos después de cada etapa de extensión, lo que eliminó la posible detección del dímero del cebador. Al final de los ciclos de PCR, se generó una curva de fusión para confirmar la especificidad del producto de PCR. Para cada operación, se emplearon diluciones en serie de plásmidos de GAPDH humanos como tipos de medida cuantitativa de la cantidad de cDNA amplificada. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo por triplicado. Se empleó un método CT comparativo para cuantificar los transcritos amplificados. Las razones medias de pliegues de los transcritos amplificados se calcularon comparando DMI/DMA, DMA/Normal, DMI/Normal e IBM/Normal.

Inmunohistoquímica

Secciones de músculos congeladas procedentes de 15 pacientes (5 cada uno con DM, PM, e IBM) cuyos estudios musculares en microarray habían sido realizados, fueron teñidos con anticuerpos contra resistencia A de mixovirus (anticuerpos anti-MxA; cortesía del Dr. Otto Haller, Departamento de Virología, Universidad de Friburgo, Alemania) según se ha descrito previamente (Greenberg, et al., *Ann. Neurol.* 57(5):664-78 (2005)), y se examinaron para determinar correlación con estudios de transcritos.

Resultados

Transcriptos de genes en sangre inducibles por interferón- α/β son los más regulados por aumento de todos los genes de PBMCs procedentes de pacientes con DM activa y en menor extensión PM activa

5 Comparando los niveles de expresión de transcriptos de DM activa (DMA) y PM activa (PMA) con controles sanos, los genes inducidos por interferón- α/β tenían los cambios de pliegues mas grandes y la más alta significación estadística entre los aproximadamente 38.500 transcriptos medidos (valores $p < 0,0001$)(Tabla 2). De los 25 genes regulados por aumento más altamente, al menos 21 (84%) se sabe que eran inducibles por interferón- α/β . Ninguno de estos genes estaba regulado por aumento significativamente en pacientes con IBM, MG o miopatías determinadas genéticamente. La magnitud de regulación por aumento era generalmente mayor en DM que en P.M.

10 Una RT-PCR cuantitativa puso de manifiesto que los genes inducibles por interferón Mx1 e IFIT1 estaban altamente regulados por aumento en la sangre de DMA apoyando las observaciones de los datos de microarray (Tabla 3). El coeficiente medio de varianza de muestras triplicadas fue 0,15 .con una correlación alta entre operaciones triplicadas de 0,99. La correlación de los datos de RT-PCR con los datos de microarray era excelente (Mx1: $R^2 = 0,9889$); IFIT1: $R^2 = 0,9978$). En general, 8 de 8 pacientes con DMA y 5 de 7 pacientes con PMA tenían niveles de sobreexpresión de genes inducibles por interferón- α/β que excedían de todas las otras 50 muestras de sangre estudiadas.

Genes inducibles por interferón- α/β están regulados por disminución con mejoría clínica de DM y PM

Se compararon perfiles de transcriptos de 8 muestras de DMA con los de 11 de DMI, y por separado, 7 muestras de PMA con 6 de PMI. Los genes más altamente regulados por disminución con mejoría de la enfermedad son, predominantemente, inducibles por interferón- α/β (Tabla 2, columnas derechas) Una RT-PCR cuantitativa confirmó del mismo modo mejoría en pacientes con DM (Tabla 3). En muestras apareadas procedentes de los mismos pacientes con DM (N=6) o PM (N=2) que tenían enfermedad activa y en mejoría en dos puntos de tiempo diferentes, los genes inducibles por interferón de tipo 1 eran de nuevo los más regulados por disminución de todos los genes. Para el único paciente con DM refractaria, se observó un cambio global pequeño de muchos genes inducibles por interferón de tipo 1 en las muestras apareadas.

La regulación por aumento de genes inducibles por interferón- α/β es mayor en la musculatura que en la sangre en DM pero no en PM ni IBM

De 15 pacientes (5 cada uno con DM, PM e IBM), se compararon los perfiles de expresión génica en sangre con la expresión génica en músculos utilizando los 13.398 genes que habían compartido entre ambos los microarrays de U133A (empleado para determinar el perfil en los músculos) y U133 más 2.0 (empleado para determinar los perfiles en sangre). En los músculos de DM hay una regulación por aumento marcada de la expresión de los mismos genes inducibles por interferón- α/β que se encontró que estaban altamente regulados por aumento en la sangre. Por el contrario, en los músculos de PM e IBM solamente estaba presente un aumento modesto de la transcripción génica inducible por interferón- α/β . Este hecho puede haber sido debido a infiltración de células del sistema inmune que por sí mismas expresan genes inducibles por interferón- α/β , tales como MxA. De interés particular en la DM, existe una sobreexpresión marcada de ciertos genes inducibles por interferón en los músculos en comparación con los de la sangre. Por ejemplo, la expresión en músculos de DM de ISG15 era aproximadamente 570 veces la de la musculatura normal y aproximadamente 100 veces mayor que en la sangre de DM.

Regulación por aumento de proteína MxA inducible por interferón- α/β que se correlaciona con patología en tejidos

40 Como se ha informado previamente, la sobreexpresión de una proteína génica inducible por interferón- α/β , MxA, está presente en la musculatura de DM (Greenberg, et al., *Ann. Neurol.* 57(5):664-78 (2005)). En el estudio actual, el nivel de transcripto de MxA, aun cuando elevado de modo semejante en sangre de DMA (6,2 veces) y en sangre de PMA (6,0 veces), era marcadamente superior por estudios de microarray en músculos de DM (281 veces) en comparación con músculos de PM (2,5 veces). El enriquecimiento marcado de transcripto de MxA en músculos de DM va acompañado de modo semejante por un enriquecimiento marcado de proteína MxA por inmunohistoquímica en comparación con secciones de músculos procedentes de DM y PM. En 4 de 5 pacientes con DM, la tinción de MxA estaba presente intensamente en muchas miofibras, en particular miofibras perifasciculares, mientras que en todos los 5 pacientes con PM y 5 con IBM, la tinción de MxA estaba limitada a la infiltración de células del sistema inmune. La tinción de MxA no está presente en biopsias de músculos normales.

50 Discusión

Los descubrimientos de los inventores sugieren que, en la mayor parte de los pacientes con DM y PM, pero no en pacientes con IBM, existe un perfil diferente de expresión génica en la sangre caracterizado por una sobreexpresión marcada de genes inducibles por interferón- α/β . La mejoría clínica durante el tratamiento inmunosupresor está asociada generalmente con reducción de la sobreexpresión de esos genes con respecto a los niveles normales.

55 Estos descubrimientos, en afinidad con la expresión génica en los músculos, tienen implicaciones en hipótesis patógenas y biomarcadores en sangre de uso potencial de diagnóstico.

Para la dermatomiositis, la señal génica de interferón- α/β en la sangre está correlacionada altamente con los descubrimientos de estudios de microarray en los músculos y apoya la hipótesis de que esta enfermedad puede ser originada por la sobreproducción sistémica e intramuscular de interferón- α/β . Señales similares de transcripción génica en sangre han sido descritas en el lupus eritematoso sistémico (SLE) (Bacchler, et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 100(5):2610-5 (2003); Bennett, et al., *J. Exp. Med.* 197(6):711-23 (2003); Han, et al., *Genes Immun.* 4(3):177-86 (2003)). La sobreexpresión en el nivel de proteína de al menos uno de estos genes (MxA) está presente en capilares y miofibras perifasciculares de los músculos de DM, y en la piel de DM (Wenzel, et al., *Br. J. Dermatol.* 153(2):462-3 y 463-4 (2005); Wenzel, et al., *Clin. Exp. Dermatol.* 31(4):576-82 (2006)). Adicionalmente, las células dendríticas plasmacíticas (pDCs), células que producen IFN- α natural, son abundantes en los músculos de DM (Greenberg, et al., *Ann. Neurol.* 57(5):664-78 (2005)), y en la piel (Wenzel, et al., *Clin. Exp. Dermatol.* 31(4):576-82 (2006)). La regulación por aumento de niveles de transcritos de MxA en sangre ha sido observada en DM juvenil y puede correlacionarse con la actividad de la enfermedad (O'Connor, et al., *Clin. Immunol.* 120(3):319-25 (2006)).

Aun cuando los perfiles en sangre exponían niveles similares de sobreexpresión de genes inducibles por interferón- α/β en DM y PM, en la musculatura algunos de esos genes tenían órdenes de magnitud expresados más altamente solo en DM. Una explicación de este hecho podría ser que aunque la activación sistémica del sistema inmune innato está presente en ambas enfermedades, la musculatura en DM está expuesta en una cantidad mayor de interferones de tipo 1 a la musculatura de PM. Esta hipótesis está apoyada por descubrimientos previos de células dendríticas plasmacíticas que segregan interferón- α/β que infiltran la musculatura de DM (Greenberg, et al., *Ann. Neurol.* 57(5):664-78 (2005)) en números mucho mayores que los observados en IBM Y PM (Greenberg, et al., *Muscle Nerve* 35(1):17-23 (2007)). Adicionalmente, mientras en PM la expresión de la proteína MxA inducible por interferón- α/β está confinada a invadir células inflamatorias, en DM la proteína MxA está presente dentro de miofibras.

El enriquecimiento de tales genes específicos inducibles por interferón- α/β en los músculos es, probablemente, una pista importante con respecto a la naturaleza del daño de los tejidos en DM. Por tanto, el enriquecimiento marcado del transcrita ISG15 en músculos de DM sugiere que de las diversas proteínas inducibles por interferón- α/β reguladas por aumento en la sangre y músculos de DM, esta molécula particular, un modificador similar a ubiquitina, podría ser de mayor importancia para los mecanismos directos de daño en tejidos en DM.

La falta diferente de genes de interferón- α/β altamente regulados por aumento en sangre de IBM, comparada con la sangre de PM, contrasta con la naturaleza de otro modo similar de anomalías inmunológicas que han sido observadas previamente en los músculos de esas dos enfermedades. Esos descubrimientos sugieren una magnitud diferente de activación del sistema inmunitario innato en PM que en IBM. Un estudio adicional de esta hipótesis podría dirigirse mejor a números mayores de pacientes. Adicionalmente, para muchos pacientes la diagnosis de IBM se retarda, reconocida solamente después de una diagnosis previa de PM resistente a glucocorticoides (Amato, et al., *Ann. Neurol.* 40(4):581-6 (1996)). Una caracterización adicional de los biomarcadores en sangre de genes inducibles por interferón- α/β en IBM Y PM, sugiere el potencial de una diagnosis precoz futura de IBM y la evitación de tratamiento con glucocorticoides de tales pacientes.

Los descubrimientos de los inventores sugieren también la utilidad de biomarcadores en sangre de actividad en la enfermedad para suplementar el tratamiento de pacientes con DM y PM. En este estudio, se han identificado biomarcadores múltiples en sangre de miositis que responde a medicación activa. Actualmente existe la necesidad de ensayos más específicos para evaluar la actividad de enfermedad en DM o PM. El nivel de creatina quinasa (CK) del suero es reflejo, en general, de actividad de enfermedad en PM, pero puede ser normal en pacientes con DM activa. La medida MITAX ha sido propuesto como medida clínica de actividad de enfermedad. Se calculó una puntuación de MITAX para los pacientes de DM, que estaba bien correlacionada con la propia evaluación de los inventores de actividad de la enfermedad. No obstante, si bien se ha expuesto que MITAX es una buena herramienta para valorar la actividad de una enfermedad, la correlación entre clases entre evaluadores para la implicación en los músculos fue baja, subrayando la necesidad de una medida más objetiva (Isenberg, et al., *Rheumatology (Oxford)* 43(1):49-54 (2004)). Un ensayo en sangre basado en PCR objetivo y barato que correlaciona la expresión de ciertos genes inducibles por interferón- α/β con la actividad de una enfermedad, podrían suplementar el tratamiento clínico de DM y PM. Eventualmente, tales pruebas proporcionarían marcadores sustitutos para la respuesta de tratamiento en ensayos clínicos.

Tabla 1. Características clínicas de 23 pacientes con dermatomiositis y polimiositis.

Se estudiaron muestras de sangre apareadas procedentes de los 9 pacientes marcadas con un asterisco (*) de un total de 32 muestras de sangre procedentes de pacientes con DM y PM.

Enfermedad del paciente ID	A/S	PA	DD	Tratamiento (Tx)	Tx--D	CK	S	Puntuación (MMT)	X	Y	Z	Otras diagnosis
Dermatomiositis (DM) N=12												
BGE10-DMA*	38/F	No	108	Pred/IVIG	4	948	↑	142	↓	↑	12	-
BGE19-DMA*	61/F	Si	12	Pred/Myco	24	165	↑	139	↓	↑	13	Ca de Pecho
BGE46-DMA*	25/F	Si	8	Pred	0,1	393	↑	128	↓	↑	12	-
BGE79-DMA*	46/F	No	72	Ninguno	0	740	↑	133	↓	↑	12	Calcinosis
BGE92-DMA*	27/F	Si	17	Pred	11	1140	↑	146	↓	↑	13	ILD, Jo-1
BGE95-DMA*	53/M	Si	25	MTX	23	6416	↑	131	↓	↑	13	Diabetes
BGE99-DMA*	21/M	Si	3	Ninguno	0	352	↑	148	↓	↑	12	-
BGE110-DMA	54/F	Si	6	Pred	2	1140	↑	146	↓	↑	13	ILD, Jo-1
BGE15-DMI	62/F	Si	36	Pred/Myco	12	80	↓	150	f	↓	2	
BGE17-DMI	70/F	No	24	Pred/IVIG/Myco	6	19	↓	123	↑	↓	2	-
BGE36-DMI	59/F	No	12	Pred/Myco	1	1652	↓	140	↓	↓	2	-
BGE80-DMI	44/F	No	1	Pred	1	71	↓	140	↓	↓	2	-
Polimiositis (PM) N=11												
BGE3-PMA	55/F	No	26	Pred/Myco	20	2100	↑	140	↓	↑	na	-
BGE32-PMA	72/F	No	3	Pred/IVIG	2	1219	↑	100	↓	↑	na	-
BGE47-PMA	72/F	No	11	Pred/Myco	9	3027	↑	118	↓	↑	na	-
BGE98-PMA	38/F	No	16	Pred	16	129	↑	139,66	↓	↑	na	MCTD

BGE106-PMA*	59/F	No	2	Ninguno	0	4720	↑	128,65	↓	↑	na	-
BGE119-PMA*	47/F	No	5	Ninguno	0	1256	↑	135	↓	↑	na	ILD/MCTD
BGE121-PMA	67/M	No	12	Ninguno	0	1102	↑	137	↓	↑	na I	ILD
BGE11-PMI	65/F	No	81	Aza/IVIG	48	472	↓	149	↑	↓	na	ILD,Jo-1
BGE26-PMI	71/F	No	29	Pred/Aza/IVIG	29	29	↓	149	↑	↓	na	ILD
BGE50-PMI	40/F	No	2	Pred/IVIG	2	663	↓	138	↑	↓	na	-
BGE58-PMI	30/M	No	25	Pred/Mtx/IVIG	25	1743	↓	119	↑	↓	na	-

A/S = Edad/sexo; AZA = azatioprina; CK=creatina quinasa; DD=Duración de la enfermedad; DMA = DM activa; DMI=DM con mejoría; DMS = miositis de seno con DM; f= completo; IVIG= inmunoglobulina intravenosa; MCTD= enfermedad tisular conjunta mixta; ILD= enfermedad pulmonar intersticial; Meds=medicaciones; MMT= ensayo de musculatura manual; PA =atrofia perifascicular; Δ =cambio; PMA =PM activa; PM I= PM con mejoría; Pred = prednisona; Myco= mofetilo de micofenolato; MTX= metotrexato; S=síntomas; MITAX= Intención de miositis para Tratar el Índice de Actividad; TxD= Duración de la enfermedad (meses); X=Δ puntuación de MMT; Y=Δ Meds.; Z=puntuación de MITAX (DM solamente).

Tabla 2. Los genes inducibles por interferón- α/β son los genes sobreexpresados más altamente en dermatomiositis y polimiositis activas, pero no en otros grupos de control.

Los genes expresados con la más alta diferenciación se enumeran por orden descendente de razones de pliegues para DM activa (DMA) en comparación con lo normal. Los símbolos de los genes de genes inducibles por interferón- α/β bien establecidos, están en negrita. La regulación por aumento en DMA (N=8) se aprecia también en PM activa (PMA; N=7), pero no en IBM activa (N=13), miastenia grave (N=5), o miopatías genéticas (N=3), comparados con los normales (Norm; N=12). Los criterios para la importancia de los genes tenían un valor $p < 0,0001$, con los 25 genes de tope ordenados por cambio de pliegues (con intervalos de confianza) enumerados. La comparación de grupos de enfermedad con Mejoría respecto a la Activa expone una regulación por disminución que ocurre con el tratamiento relacionado con la mejoría.

Símbolo de los genes	Título de los genes	Comparaciones de grupos de enfermedades						Comparación mejoría/activa	
		A	B	C	D	E	F	G	H
IFI27	prt 27 inducible por interferón alfa	7,94 E-06	130 (28-	21,65	2,79	1,01	0,94	-2,34	1,31
IFI44L	similares a prt44 inducidas por	2,84 E-07	104 (39-	64,23	7,01	0,68	4,09	-9,65	-5,16
RSAD2	dominio del radical S-adenosilo /CIG5	2,20 E-07	66 (26-	42,04	4,63	1,09	2,98	-9,76	-6,00
IFI44	prt44 inducida por interferón	1,61 E-06	57 (17-	27,28	2,94	0,52	1,46	-21,26	-7,11
LOC129607	prt hipotética LOC129607	4,74 E-09	47 (20-	29,34	3,48	1,20	2,51	-16,42	-5,68
OASI	2',5'-oligoadenilato sintetasa 1	3,80 E-09	36 (13-84)	15,13	2,05	0,35	1,04	-18,22	-3,90
EPST11	interacción 1 estromal epitelial	4,27 E-07	33 (15-57)	16,24	3,09	0,73	3,50	-17,93	-2,21
BIRC4BP	factor 1 asociado a XIAP	7,99 E-06	24 (12-39)	17,38	4,18	0,78	1,76	-13,25	-3,45
IFIT5	tetratricopéptido 5 inducido por interferón	6,81 E-06	20 (10-32)	14,65	2,63	0,89	1,98	-13,24	-3,65
OASL	similares a 2',5'-oligoadenilato sintetasa	3,23 E-08	19 (9-50)	9,49	2,42	0,38	0,84	-11,07	-3,92
OAS3	2',5'-oligoadenilato sintetasa 3	7,74 E-06	19 (8-34)	12,68	1,94	0,60	1,38	-13,18	-5,02
IFIT1	tetratricopéptido 1 inducido por interferón	2,87 E-06	18 (8-47)	15,50	1,92	0,37	1,45	-8,93	-7,83
PLSCR1	escramblase 1 de fosfolípido	5,49 E-07	16 (9-25)	14,97	3,57	5,68	2,69	-4,19	-2,35
HERC5	dominio hect y RLD5	1,21 E-06	15 (5-30)	11,62	1,91	0,49	1,13	-13,58	-4,14
EIF2AK2	prt quinasa inducible por interferón	2,78 E-06	13 (7-24)	12,18	4,59	1,52	3,16	-6,23	-1,76
TNFSF10	superfamilia de TNF, miembro 10	6,42 E-05	13 (7-21)	10,79	3,58	2,69	3,26	-5,21	-2,56
GBP1	prt 1 de unión a guanilato	3,26 E-05	13 (6-21)	6,73	3,83	0,54	3,32	-9,79	-1,75
TNFAIP6	TNF, prt 6 inducida por alfa	4,83 E-06	11 (6-17)	8,05	1,76	3,06	1,65	-4,44	-2,00
IFIT3	tetratricopéptido 3 inducido por interferón	5,46 E-08	9 (6-14)	7,41	1,84	0,59	1,82	-5,45	-2,95
SAMD9L	similares a dominio 9 de motivo de alfa estéril	1,59 E-05	9 (5-17)	13,96	7,58	0,39	2,10	-13,71	1,31
CHMP5	proteína 5 que modifica cromatina	4,21 E-05	8 (5-13)	6,42	1,60	1,90	1,88	-4,21	-2,44
ISG15	modificador similar a ubiquitina ISG15	5,24 E-05	9 (4-15)	4,86	1,04	0,19	0,55	-5,05	-4,62
OAS2	2',5'-oligoadenilato sintetasa 2	5,94 E-05	8 (4-14)	4,15	0,94	0,38	1,23	-9,74	-6,46

Símbolo de los genes	Título de los genes	Comparaciones de grupos de enfermedades						Comparación mejoría/activa	
		A	B	C	D	E	F	G	H
IFIH1	dominio 1 de helicasa C inducido	1,50 E-05	7 (4-10)	7,40	1,86	0,50	1,74	-8,09	-2,97
MX1	resistencia 1 de mixovirus	5,21 E-06	6 (3-13)	6,04	1,69	0,21	0,83	-4,54	-4,65

prt-proteína; A=valor p de DMA/norm; B= Pliegue de DMA/norm (intervalo de confianza); C Pliegue de PMA/norm; D= Pliegue de IBM/norm; E= Pliegue de MG/norm; F Pliegue de DYS/norm.;

5 Tabla 3. PCR de Transcriptasa Inversa Cuantitativa de transcritos Mx1 e IFIT1

Había transcritos en la sangre de DM activa (DMA; N=4), DM en mejoría (DMI; N=5), IBM (N=4) y voluntarios sanos (N=5); se indican las razones de pliegues. Los transcritos están regulados por aumento en DM en comparación con los normales y otras miopatías inflamatorias. La correlación de RT-PCR con los datos de microarray era excelente (Mx1: $R^2 = 0,9889$; IFIT1; $R^2=0,9978$).

Símbolos de los genes	DMI/DMA	DMA/Norm	DMI/Norm	IBM/Norm
IFIT1-array	-468	15,87	1,18	0,77
IFI1-rtPCR	-9,31	55,55	5,97	1,77
Mx1-array	-5,47	5,93	1,97	1,29
Mx1-rtPCR	-4,45	25,68	5,77	1,38

10

Tabla 4: Lista de transcritos de RNA génicos en sangre

Genes identificados por el Centro Nacional único de número ID de Bioinformatics UniGene, que representa todas las secuencias existentes dentro de la base de datos de GenBank; se proporciona un número ID de GenBank único como ejemplo de una secuencia representativa.

Símbolos de los genes	Nombres de los genes	ID de UniGene	ID de GenBank
IFI27	proteína 27 inducible por interferón alfa	Hs.532634	BT006781.1
IFI44	proteína 44 inducida por interferón	Hs.82316	NM 006417.4
IFI44L	similar a proteína 44 inducida por interferón	Hs.389724	NM 006820.2
CMPK2	Citidina monofosfato quinasa	Hs.7155	NM 207315.2
EIF2AK2	proteína quinasa inducible por interferón	Hs.131431	AY302136.1
EPSTI1	interacción 1estromal epitelial	Hs.546467	AF396928.1
BIRC4BP	factor 1 asociado a XIAP	Hs.441975	BC058017.1
OAS1	2',5'-oligoadenilato sintetasa 1	Hs.524760	BT006785.1
OAS2	2',5'-oligoadenilato sintetasa 2	Hs.414332	BC049215.1
OAS3	2',5'-oligoadenilato sintetasa 3	Hs. 528634	NM 006187.2
OASL	2'.5'-oligoadenilato sintetasa, similar	Hs.118633	AJ225089.1
IFIT1	tetratricopéptido 1 inducido por interferón	Hs.20315	BT006667.1
IFIT2	tetratricopéptido 2 inducido por interferón	Hs.437609	AK312831.1
IFIT3	tetratricopéptido 3 inducido por interferón	Hs.714337	BT007284.1
IFIT5	tetratricopéptido 5 inducido por interferón	Hs.252839	NM 012420.1
PLSCR1	escramblase 1 de fosfolípido	Hs.130759	AF098642.1
HERC5	dominio hect y RLD5	Hs.26663	AB027289.1
GBP1	proteína 1 de unión a guanilato	Hs.62661	BT006847.1
MX1	resistencia 1 de mixovirus	Hs.517307	M30817.1
RSAD2	dominio del radical S-adenosilo /CIG5	Hs.17518	BC017969.1
SAMD9L	dominio 9 similar de motivo de alfa estéril	Hs.489118	BC127118.1
TNFAIP6	TNF, proteína 6 inducida por alfa	Hs.437322	NM_007115.2

ES 2 542 836 T3

TNFSF10	superfamilia de TNF, miembro 10	Hs.478275	NM_003810.2
CHMP5	proteína 5 que modifica cromatina	Hs.635313	AF229832.1
ISG15	modificador similar a ubiquitina ISG15	Hs.458485	M13755.1
IFIH1	dominio 1 de helicasa C inducido por interferón	Hs.163173	BC046208.1

Lista de secuencias

- 5 <110> The Brigham and Women's Hospital, Inc.
- <120> Composiciones y métodos para diagnosticar y evaluar miopatías inflamatorias
<130> REP08655EP2
- 10 <150> EP 08780008.2
<151> 2008-07-07
- <150> PCT/US2008/008333
<151> 2008-07-07
- 15 <150> US 60/929,775
<151> 2007-07-12
- <160> 4
- 20 <170> PatentIn version 3.4
- <210> 1
<211> 20
<212> DNA
25 <213> Homo sapiens
- <400> 1
- 30 cggctaacgg ataagcagag 20
- <210> 2
<211> 20
<212> DNA
35 <213> Homo sapiens
- <400> 2
- acctacagct ggctcctgaa 20
- 40 <210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
- 45 <400> 3
- aaaagccac attgaggtg 20
- <210> 4
50 <211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
- <400> 4
- 55 gaaattcctg aaaccgacca 20

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para determinar si un sujeto manifiesta un patrón de expresión de genes característico de dermatomiositis o polimiositis, y no característico de miositis de inclusión corporal (IBM), que comprende:
- 5 a) ensayar una muestra biológica de prueba procedente de dicho sujeto que contiene células mononucleares de sangre periférica, para la expresión del dominio del radical S-adenosilo génico /CIG5 (RSAD2);
- b) decidir que dicho sujeto tiene un perfil de expresión de genes que es característico de dermatomiositis o polimiositis, y que no es característico de IBM, si los resultados determinados en el ensayo indican que el gen RSAD2 está expresado al menos 10 veces más alto en dicha muestra de prueba que en una o más muestras de control.
- 10 2.- El método según la reivindicación 1, en donde dicha muestra biológica es una muestra de sangre, plasma o suero.
- 3.- El método según cualquier reivindicación precedente, en donde dicho ensayo se lleva a cabo empleando una placa de microarray
- 15 4.- El método según cualquier reivindicación precedente, que comprende además ensayar la muestra de prueba para la expresión de uno o más genes adicionales seleccionados del grupo que consiste en: proteína 27 inducible por interferón alfa, proteína 44 similar inducida por interferón, proteína 44 inducida por interferón; proteína hipotética LOC129607; 2',5'-oligoadenilato sintetasa 1; factor 1 asociado a XIAP; tetratricopéptido 5 inducido por interferón; 2',5'-oligoadenilato sintetasa similar; 2',5'-oligoadenilato sintetasa 3; tetratricopéptido 1 inducido por interferón; escramblase 1 de fosfolípido; dominio hect y RLD 5; proteína quinasa inducible por interferón; miembro 10 de superfamilia de TNF; proteína 1 de unión a guanilato; proteína 6 inducida por alfa de TNF; tetratricopéptido 3 inducido por interferón; dominio 9 similar de motivo de alfa estéril; proteína 5 que modifica cromatina; modificador similar de ubiquitina ISG15; 2',5'-oligoadenilato sintetasa 2; dominio 1 de helicasa C inducido por interferón; resistencia 1 de mixovirus; y gen 1 de interacción estromal epitelial.
- 20 5.- El método según la reivindicación 4, en donde se ensayan al menos 5 genes.
- 25 6.- El método según la reivindicación 5, en donde se ensayan al menos 15 genes.
- 7.- El método según cualquier reivindicación precedente, en donde el ensayo se lleva a cabo empleando una placa de microarray que comprende una serie de oligonucleótidos diferentes inmovilizados, en donde:
- a) dichos oligonucleótidos se hibridan en condiciones restrictivas específicamente con una secuencia génica del gen definido en la reivindicación 1;
- 30 b) dichos oligonucleótidos están inmovilizados en una posición de dicha placa de microarray que no contiene oligonucleótidos que se hibridan con otras secuencia en condiciones restrictivas; y
- c) dicha placa de microarray comprende no más de 100 oligonucleótidos diferentes inmovilizados en total.
- 35 8.- El método según la reivindicación 7, en donde dicha placa de microarray comprende adicionalmente oligonucleótidos que se hibridan en condiciones restrictivas específicamente con secuencias génicas de uno o más de proteína 27 inducible por interferón alfa; proteína 44 similar inducida por interferón; proteína 44 inducida por interferón; proteína hipotética LOC129607; 2',5'-oligoadenilato sintetasa 1; factor 1 asociado a XIAP; tetratricopéptido 5 inducido por interferón; 2',5'-oligoadenilato sintetasa similar; 2',5'-oligoadenilato sintetasa 3; tetratricopéptido 1 inducido por interferón; escramblase 1 de fosfolípido; dominio hect y RLD 5; proteína quinasa inducible por interferón; miembro 10 de superfamilia de TNF; proteína 1 de unión a guanilato; proteína 6 inducida por
- 40 alfa de TNF; tetratricopéptido 3 inducido por interferón; dominio 9 similar de motivo de alfa estéril; proteína 5 que modifica cromatina; modificador similar de ubiquitina ISG15; 2',5'-oligoadenilato sintetasa 2; dominio 1 de helicasa C inducido por interferón; resistencia 1 de mixovirus; y gen 1 de interacción estromal epitelial.
- 9.- El método según la reivindicación 8, en donde dicha placa de microarray comprende al menos 10 de los oligonucleótidos diferentes inmovilizados, preferiblemente al menos 15 de los oligonucleótidos diferentes inmovilizados, y que comprende preferiblemente oligonucleótidos diferentes inmovilizados que se hibridan en
- 45 condiciones restrictivas específicamente con todos dichos genes.
- 10.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde dicha placa de microarray comprende no más que 50 oligonucleótidos diferentes inmovilizados en total.
- 50 11.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde dicha placa de microarray no comprende oligonucleótidos diferentes inmovilizados que se hibridan en condiciones restrictivas con un gen distinto de uno de dichos genes..

12.- El método según cualquier reivindicación precedente, en donde si el resultado determinado en la etapa de ensayo indica que el gen RSAD2 se expresa al menos 20 veces más alto en dicha muestra de prueba que en una o más de las muestras de control, entonces puede decidirse que dicho sujeto tiene un perfil de expresión génica que es característico de dermatomiositis o polimiositis y que no es característico de IBM.