

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 688**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2007 E 07818398 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 2074428**

54 Título: **Método de evaluación del riesgo de progresión de enfermedad de pacientes con artritis reumatoide**

30 Prioridad:

29.09.2006 EP 06020645

19.10.2006 EP 06021887

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

15.09.2015

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)

Grenzacherstrasse 124

4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

KARL, JOHANN;

GRUNERT, VEIT PETER;

ROLLINGER, WOLFGANG y

WILD, NORBERT

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 545 688 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 de evaluación del riesgo de progresión de enfermedad de pacientes con artritis reumatoide

5 La presente invención se refiere a un método *in vitro* de ayuda en la evaluación adicional de los pacientes que sufren de artritis reumatoide. El método se utiliza especialmente en la evaluación de si un paciente de AR se encuentra en riesgo de progresión de la enfermedad. El método se pone en práctica, por ejemplo, mediante el análisis de marcadores bioquímicos, que comprende medir en una muestra la concentración de por lo menos proteína C reactiva (PCR) e interleuquina-6 y correlacionar las concentraciones determinadas con la probabilidad de una forma subyacente de progresión rápida de la AR. Un paciente de alto riesgo de enfermedad de progresión rápida podría ser un paciente que necesita de tratamiento o en caso de estar ya tratado, en necesidad de un tratamiento diferente y más eficaz.

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

20 La AR presenta una distribución mundial y afecta a 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 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, en donde algunas estadísticas indican que 6,5 a 8 millones de personas están potencialmente afectadas por la enfermedad. Las mujeres resultan afectadas 2 a 3 veces más que los hombres.

25 Los primeros síntomas de la artritis reumatoide son mayoritariamente específicos, tales como dolor en las articulaciones con hinchazón o sensibilidad en las articulaciones, aunque también pueden incluir manifestaciones no específicas, tales como rigidez, fiebre, nódulos subcutáneos y fatiga. Es muy característica la afectación simétrica de las articulaciones. Resultan afectadas más comúnmente las articulaciones de las manos, pies, rodillas y muñecas, con una posterior afectación de las caderas, codos y hombros. A medida que progresa la enfermedad, cualquier tipo de movimiento resulta 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 articular. Anualmente se llevan a cabo unos 300.000 procedimientos quirúrgicos de sustitución de huesos y articulaciones, en un esfuerzo por aliviar el dolor y la pérdida de movilidad resultante de la destrucción articular relacionada con la artritis.

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

45 Los cambios histológicos en la AR no son específicos de la enfermedad sino que dependen en gran medida del órgano afectado. La lesión articular inflamatoria principal implica el sinovio. Los primeros cambios son el daño en la microvasculatura sinovial con oclusión del lumen, hinchazón de las células endoteliales y huecos entre las células endoteliales, tal como se documenta mediante microscopía electrónica. Este estadio habitualmente se asocia 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 los macrófagos, 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 la inflamación se asocia a congestión, edema y exudación de fibrina. Se produce infiltración celular en la enfermedad temprana 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.

60 El tejido de granulación se extiende hasta el cartílago y es conocido como pannus. El tejido invade activamente y destruye el hueso periarticular y el cartílago en el margen entre el sinovio y el hueso, conocido como AR erosiva.

65 Las manifestaciones articulares de la AR pueden clasificarse en dos categorías: signos y síntomas reversibles relacionados con la sinovitis inflamatoria y daños estructurales irreversibles causados por la sinovitis. Este concepto resulta útil no sólo para la estadificación de la enfermedad y la determinación del pronóstico sino también para seleccionar el tratamiento médico o quirúrgico. El daño estructural en el paciente típico habitualmente se inicia en cierto momento entre el primer y el segundo años de la enfermedad (van der Heijde D.M. *et al.*, *Br. J. Rheumatol.*

34(supl. 2):74-78, 1995). Aunque la sinovitis tiende a seguir un patrón fluctuante, el daño estructural progresa como función lineal de la magnitud de la sinovitis previa. La etiología de los sucesos tempranos en la AR sigue sin conocerse con exactitud. Actualmente se acepta ampliamente que existe un componente autoinmunológico, aunque se siguen investigando otros factores. Se ha investigado intensamente la posibilidad de una infección bacteriana o vírica. Todos los esfuerzos por asociar un agente infeccioso a la AR mediante aislamiento, microscopía electrónica o biología molecular han fracasado. Posiblemente no existe una única causa primaria de la AR y podría ser que diferentes mecanismos conduzcan a la lesión inicial del tejido y precipiten la inflamación sinovial.

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 el deterioro progresivo funcional y anatómico. El daño estructural de la articulación es irreversible y aditivo.

Los datos de estudios clínicos y epidemiológicos longitudinales proporcionan una guía para el tratamiento. Estos estudios subrayan: 1) la necesidad del 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 prevenir el daño articular irreversible.

El tratamiento efectivo de la artritis reumatoide generalmente comprende una combinación de medicación, ejercicio, reposo y una terapia de protección articular apropiada. La terapia para el paciente particular depende de la gravedad de la enfermedad y las articulaciones afectadas. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, los corticosteroides, las sales de oro, el metotrexato y los inmunosupresores sistémicos son ampliamente utilizados para reducir la inflamación y la destrucción articular. Sin embargo, la utilización de esteroides e inmunosupresores presenta riesgos significativos y efectos secundarios 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 "agentes biológicos". Dichos terapéuticos son, por ejemplo, receptores solubles o anticuerpos dirigidos contra FNT- α que reducen significativamente la inflamación. Aunque muy prometedores, los agentes biológicos todavía se utilizan poco debido al elevado coste.

Las circunstancias ideales para establecer un diagnóstico o evaluar el riesgo de progresión de la enfermedad serían una situación en la que un único suceso o proceso causaría la enfermedad respectiva tal como, por ejemplo, en 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 por completo, tal como ocurre en la AR. Por lo tanto, en la AR, generalmente se consideran de manera conjunta diversos síntomas clínicos y marcadores biológicos en el diagnóstico de la AR o en la evaluación del riesgo de progresión de la enfermedad.

El primer marcador bioquímico y el único aceptado generalmente (ver los criterios ARA, anteriormente indicados) para ayudar en el diagnóstico de la AR es el factor reumatoide (FR) tal como se detecta en el suero. Recientemente se ha introducido un nuevo marcador denominado anti-PCC. Se ha confirmado en muchos estudios independientes que los autoanticuerpos contra los péptidos cíclicos citrulinados (anti-PCC) representan un marcador altamente sensible y específico para el diagnóstico de la AR.

Los anti-PCC han sido estudiados intensivamente durante los últimos años por varios grupos de investigadores (ver, por ejemplo, los documentos nº WO 98/08946, nº WO 98/22503, nº WO 99/28344, nº WO 99/35167, nº WO 01/46222 y nº WO 03/050542). Recientemente Schellekens y colaboradores (Schellekens G.A., *Arthritis Rheum.* 43:155-163, 2000) informan de que un ensayo ELISA basado en péptidos cíclicos citrulinados (PCC) específicos mostraba características de rendimiento superiores con respecto a la exactitud diagnóstica de la AR en comparación con el mismo ensayo aunque con péptidos lineales.

Los autoanticuerpos contra PCC, es decir, anticuerpos que muy probablemente son reactivos con los polipéptidos citrulinados circulantes en el suero del paciente y que se unen a los PCC en un ensayo *in vitro* denominado "anti-PCC". La solicitud de patente de van Venroji *et al.* (documento nº WO 98/22503) describe determinados péptidos citrulinados y demuestra que la ciclización conduce a una mayor reactividad de los autoanticuerpos con dichos péptidos. Mediante la utilización de PCC mejorados como antígeno para la detección de anticuerpos anti-PCC se incrementa la sensibilidad a 63% en comparación con 36% respecto a los péptidos lineales correspondientes. Debido a que los autoanticuerpos en el suero del paciente presentan una reactividad ligeramente diferente con diferentes péptidos cíclicos, en el documento nº WO 98/22503 se ha propuesto una combinación de péptidos para mejorar adicionalmente el ensayo.

Muchos grupos de investigación han demostrado recientemente y confirmado que anti-PCC es un marcador todavía más sensible y específico para establecer el diagnóstico de la AR que el FR. Los autoanticuerpos anti-PCC son altamente específicos para la AR (especificidad de aprox. 97%), con una sensibilidad comparable a la del FR (65% a 80%) (Lee D.M. y Schur P.H., *Ann. Rheum. Dis.* 62:870-874, 2003; Pruijn G.J.M. *et al.*, *Curr. Rheumatol. Rev.* 1:1-7, 2005; Vallbracht I. *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.* 63:1079-1084, 2004). Además, resulta de valor diagnóstico adicional que anti-PCC pueda detectarse en un porcentaje significativo de pacientes de AR seronegativos (van Paassen P. *et al.*,

Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. 17:475-494, 2003; Vallbracht I. *et al.*, Ann. Rheum. Dis. 63:1079-1084, 2004; Schellekens G.A. *et al.*, Arthritis and Rheumatism 43:155-163, 2000). Lo anterior implica que los autoanticuerpos anti-PCC se encuentran presentes en una fracción significativa de los pacientes (sero-)negativos para FR.

5 Tal como se ha comentado anteriormente, el establecimiento de un diagnóstico de AR y la decisión por la opción de tratamiento óptima no es una tarea fácil. El curso de la enfermedad en pacientes individuales de AR varía significativamente. Actualmente no existe ningún grupo único y generalmente aceptado de indicadores para un mal resultado de la AR. Entre los indicadores asociados a un mal pronóstico se incluyen, por ejemplo, la inflamación articular acumulada, los niveles elevados de TSE o PCR, la positividad para el FR, las erosiones radiológicas tempranas, las puntuaciones más bajas de función y las circunstancias socioeconómicas adversas.

Para complicar todavía más las cosas, la evaluación de un pronóstico de la AR también adolece de la falta de una definición clara y generalmente aceptada de progresión de la enfermedad.

15 Se han desarrollado varias puntuaciones, basadas en los síntomas clínicos, los cambios radiográficos o la función física, con el fin de evaluar la respuesta al tratamiento de la AR. Sin embargo, la mayoría de dichas puntuaciones se utilizan únicamente en contextos de ensayo clínico, y raramente o nunca en la práctica reumatológica. Son ejemplos los diferentes criterios de respuesta ideados por la American College of Rheumatology (ACR) y la European League against Rheumatism (EULAR) (Felson D.T. *et al.*, Arthritis and Rheumatism 38:727-735, 1995; van Gestel A.M. *et al.*, Arthritis and Rheumatism 39:34-40, 1996). Ambos (los criterios de mejora de la ACR y los criterios de respuesta de EULAR) son ampliamente utilizados en el contexto del ensayo clínico, pero no en la práctica clínica. Lo mismo es cierto para los sistemas de puntuación para la evaluación de los cambios radiográficos según Sharp o Larsen y actualmente se dispone de varias modificaciones de los mismos. Aunque se utiliza los rayos X para el seguimiento de la progresión de la enfermedad radiográfica a intervalos periódicos, sólo se comparan con las radiografías previas pero no se puntúan.

Además, en Europa la PAE (puntuación de actividad de la enfermedad) y simplificaciones de la misma (PAE28, SDAI, CDAI) se utilizan ampliamente para el seguimiento de la enfermedad bajo terapia. El PAE incluye puntuaciones de articulaciones sensibles e hinchadas, TSE o PCR y una evaluación global de la actividad de la enfermedad (utilizando una EVA, escala visual analógica). En menor grado también las evaluaciones de la función física desempeñan un papel en el seguimiento de los estados de enfermedad. Se basan en diferentes cuestionarios de los pacientes, siendo el más ampliamente utilizado en la AR el HAQ (por sus siglas en inglés, Health Assessment Questionnaire [Cuestionario de evaluación de la salud]) (Bruce B. y Fries J.F., Health Qual. Life Outcomes 1:20, 2003) y FC-36 (formulario corto 36) (Talamo J. *et al.*, Brit. J. Rheumatol. 36:463-469, 1997).

35 Sin embargo, las herramientas anteriormente indicadas están lejos de ser óptimas. Resultan laboriosas de utilizar y se ven influidas por la subjetividad de la evaluación, por ejemplo en el caso de la HAQ o las puntuaciones de articulaciones sensibles/hinchadas.

40 Recientemente se han realizado intentos para evaluar adicionalmente diversos aspectos de la AR mediante la inclusión de más marcadores bioquímicos en dicha evaluación o incluso para basar dicha evaluación en marcadores bioquímicos.

Badolato R. y Oppenheim J. (Seminars in Arthritis and Rheumatism 26(2), octubre de 1996: 526-538) estudiaron el papel de las citoquinas, las proteínas de fase aguda y las quimoquinas en la progresión de la artritis reumatoide.

45 Coste J. *et al.* (The Journal of Rheumatology 24:28-34, 1997) han investigado veinte parámetros clínicos y de laboratorio para su capacidad de predecir la destrucción articular en la AR. Se han encontrado correlaciones estadísticamente significativas con la progresión de la enfermedad para el hierro, la PCR, la TSE y la glucoproteína ácida $\alpha 1$. Sin embargo, las correlaciones no eran muy fuertes y sólo se observaban para los primeros 6 meses de seguimiento.

Baum, J., Consultant 1998 United States, vol. 38, nº 5, páginas 1341 a 1348, informan de que la utilización de los ensayos para la tasa de sedimentación de eritrocitos (TSE) y la proteína C reactiva (PCR) en la AR.

55 Aman S. *et al.*, Rheumatology 39:1009-1013, 2000, han investigado si la progresión de la enfermedad en la AR podía predecirse con los marcadores ICTP, FR y PCR. Encontraron cocientes de probabilidades ("odds ratios") de entre 2,6 y 3,9 para los marcadores individuales y el mejor marcador presentaba un cociente de probabilidades de 9,1. Este cociente de probabilidades se traducía en una especificidad de 71% a una sensibilidad de 77%. Sin embargo, una especificidad de 71% es bastante baja, ya que en la rutina clínica se requiere una especificidad de por lo menos 80%, o preferentemente de incluso por lo menos 90%.

65 Visser H. *et al.*, Arthritis and Rheumatism 46:357-365, 2002, han propuesto "un modelo predictivo de la artritis (erosiva) persistente". El modelo predictivo desarrollado consistía de 7 variables: duración del síntoma en la primera visita, rigidez matutina durante ≥ 1 hora, artritis en ≥ 3 articulaciones, dolor de compresión bilateral en las articulaciones metatarsofalángicas, positividad de factor reumatoide, positividad de anticuerpo anti-péptido cíclico

citrulinado y presencia de erosiones (manos/pies). Tal como puede observarse, dos marcadores bioquímicos, FR y anti-PCC, formaban parte de su algoritmo.

5 Rooney P. *et al.*, *Arthritis and Rheumatism* 52:9, página S564, 2005) estudiaron biomarcadores séricos de actividad de enfermedad y progresión radiográfica en pacientes que reciben terapias biológicas para la artritis reumatoide. Concluyeron que “los niveles séricos de citoquinas, MMP y sus inhibidores pueden utilizarse como biomarcadores de actividad de enfermedad y como factores predictivos de progresión radiográfica en la AR”.

10 Recientemente Meyer O. *et al.* (*Arthritis Research and Therapy* 8/2, R40, 2006) han propuesto la utilización de determinaciones en serie de autoanticuerpos anti-PCC para predecir los resultados radiológicos tras cinco años de seguimiento. Demostraron que la determinación de anti-PCC en la línea base no es un factor predictivo suficiente de progresión de la enfermedad. Sin embargo, una ayuda en la predicción de la progresión en la línea base es exactamente lo que necesita el médico.

15 Mientras que tanto FR como anti-PCC son herramientas importantes en el establecimiento del diagnóstico de AR, aparentemente no son una ayuda potente en la predicción del curso futuro de la enfermedad. Se han propuesto muchos marcadores o grupos de marcadores; sin embargo, el cociente de probabilidades conseguido hasta el momento no ha resultado suficiente o se ha basado en una variedad excesiva de parámetros bioquímicos y clínicos para satisfacer los requisitos rutinarios clínicos.

20 Por lo tanto, existe una necesidad enorme de un método, especialmente uno basado en parámetros bioquímicos, que ayude a evaluar si un paciente de AR está en riesgo de progresión de la enfermedad o no.

25 Ahora se ha encontrado inesperadamente que los dos marcadores PCR e interleuquina-6 se complementan entre sí y conducen de esta manera a una mejora de la evaluación del riesgo de un paciente de experimentar un curso más severo de la AR. Se espera que la presente invención supere por lo menos parcialmente los problemas existentes en el campo de la evaluación de si un paciente de AR está en riesgo de progresión de la enfermedad al proporcionar métodos y reactivos para evaluar si un paciente de AR está en riesgo de progresión de la enfermedad *in vitro*.

30 Descripción resumida de la invención:

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para ayudar a evaluar el riesgo de progresión de la enfermedad de un paciente que presenta artritis reumatoide (AR), comprendiendo el método las etapas de medir en una muestra líquida la concentración de tanto la proteína C reactiva (PCR) como la interleuquina-6, y opcionalmente de otro u otros marcadores, combinar matemáticamente los valores medidos y correlacionar las concentraciones determinadas para PCR e interleuquina-6 y opcionalmente otro u otros marcadores, con el riesgo de progresión de la enfermedad, en el que dicho método de combinación matemática de los valores se selecciona de entre AD (es decir, análisis discriminante lineal, cuadrático, regularizado), métodos de núcleo (es decir, SVM), métodos no paramétricos (es decir, clasificadores del vecino k más próximo), CMP (cuadrados mínimos parciales), métodos basados en árboles (es decir, regresión lógica, CART, métodos de bosque aleatorio, métodos de "boosting") o modelos lineales generalizados (es decir, regresión logística).

45 En una primera realización preferente, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para ayudar a evaluar el riesgo de progresión de la enfermedad de un paciente que presenta artritis reumatoide (AR), comprendiendo el método las etapas de: a) medir en una muestra líquida la concentración de tanto la proteína C reactiva (PCR) como la interleuquina-6, y opcionalmente de otro u otros marcadores, b) combinar matemáticamente los valores medidos en la etapa a) y c) correlacionar el valor combinado determinado en la etapa b) con el riesgo de progresión de la enfermedad, en el que dicho método de combinación matemática de los valores en la etapa (b) se selecciona de entre AD (es decir, análisis discriminante lineal, cuadrático, regularizado), métodos de núcleo (es decir, SVM), métodos no paramétricos (es decir, clasificadores del vecino k más próximo), CMP (cuadrados mínimos parciales), métodos basados en árboles (es decir, regresión lógica, CART, métodos de bosque aleatorio, métodos de "boosting") o modelos lineales generalizados (es decir, regresión logística).

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

Los artículos “un” y “una” se utilizan en la presente memoria para referirse a uno o 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.

60 El término “marcador” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a tanto marcadores bioquímicos como a marcadores clínicos. Los términos marcador y parámetro se utilizan intercambiamente.

65 Un “marcador bioquímico” o “biomarcador” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una biomolécula que se utilizará como diana para analizar muestras de ensayo del paciente. Son ejemplos de dichas dianas moleculares, ácidos nucleicos, proteínas o polipéptidos, así como anticuerpos presentes en una muestra.

Un “marcador clínico” en el sentido de la presente invención se refiere a la evaluación clínica estandarizada de un paciente de AR. Los marcadores clínicos preferentes son puntuaciones como una puntuación de actividad de enfermedad y/o una puntuación radiológica.

5 Entre las proteínas o polipéptidos utilizados como marcador en la presente invención que se encuentran contemplados se incluyen cualesquiera variantes de dicha proteína, así como fragmentos de dicha proteína o dicha variante, en particular fragmentos inmunológicamente detectables presentes en un líquido corporal del paciente. El experto en la materia reconocerá que las proteínas que son liberadas por las células o que se encuentran presentes en la matriz extracelular que resulten dañadas, por ejemplo durante la inflamación, podrían degradarse o resultar cortadas en dichos fragmentos. Determinados marcadores son sintetizados en una forma inactiva, que posteriormente puede ser activada mediante proteólisis. Tal como apreciará el experto en la materia, las proteínas o fragmentos de las mismas también pueden encontrarse presentes 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 adicionalmente o alternativamente, pueden aparecer por la diferente modificación post-traduccional (por ejemplo glucosilación, acilación y/o fosforilación).

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

25 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 del 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 plasma o suero los más preferentes. La muestra se utiliza meramente para el método diagnóstico *in vitro* de la invención y el material restante de la muestra no se transfiere de vuelta al cuerpo del paciente. La muestra se descarta después de la realización del análisis.

35 La expresión “de ayuda” en la evaluación del riesgo de progresión de la enfermedad se utiliza para indicar que el método según la presente invención ayudará (conjuntamente con otras variables, por ejemplo parámetros clínicos o los parámetros dados a conocer en las reivindicaciones dependientes) al médico a evaluar el riesgo de progresión de enfermedad de un paciente que presenta artritis reumatoide. La presente invención se refiere a un método *in vitro* de evaluación del riesgo de progresión de enfermedad para un paciente que presenta artritis reumatoide (AR), comprendiendo el método las etapas de: a) obtener una muestra líquida, b) medir en dicha muestra la concentración de tanto proteína C reactiva (PCR) como interleuquina-6, y opcionalmente de otro u otros marcadores, y c) correlacionar las concentraciones determinadas en la etapa (b) con el riesgo de progresión de la enfermedad. Dicho método será uno de los componentes tomados en consideración por el médico, ayudando de esta manera, es decir, siendo de ayuda, en la evaluación del riesgo de progresión de enfermedad.

45 Las expresiones “evaluar el riesgo” o “evaluación de la probabilidad”, por ejemplo de progresión de la enfermedad, se utilizan para indicar que al poner en práctica el método según la presente invención, el resultado en todos los casos indicará un riesgo relativo o una probabilidad relativa de AR progresiva. Cuanto más alto sea el resultado, más alto será el riesgo relativo de que el paciente de AR experimente un curso progresivo de la enfermedad.

50 La “progresión de la enfermedad” en el sentido de la presente invención se evalúa con la puntuación de Sharp-Genant.

Un paciente con una tasa de progresión >5 al año (cambio de la puntuación de Sharp-Genant respecto a la línea base tras uno o dos años) se clasifica como un paciente de AR con progresión de la enfermedad.

55 Todos los demás pacientes se clasifican como no presentando progresión de la enfermedad

Un “paciente con artritis reumatoide” es un paciente que cumple los criterios revisados desarrollados para la clasificación de la artritis reumatoide de la American Rheumatism Association (Arnett F.C. *et al.*, *Arthritis Rheum.* 31:315-324, 1988). Se incluyen estos criterios en la presente memoria como referencia.

60 Los inventores de la presente invención han definido dos subgrupos de pacientes de AR, uno que muestra progresión de la enfermedad, y una población o subgrupo de referencia de AR que no muestra progresión de la enfermedad e investigaron el potencial de los marcadores bioquímicos de predecir la progresión de la enfermedad basándose en dichas cohortes de pacientes.

65

Inesperadamente se pudo encontrar y se estableció que la combinación de marcadores de PCR más interleuquina-6 es clave para mejorar la sensibilidad de la predicción del curso de la enfermedad para un paciente de AR al nivel clínicamente requerido de elevada especificidad.

5 En un método según la presente invención, se determina por lo menos la concentración de los biomarcadores PCR e IL-6, respectivamente, y dicha combinación de marcadores se correlaciona con el riesgo de progresión de la enfermedad para el paciente diagnosticado de AR.

10 Tal como apreciará el experto en la materia, la etapa de correlacionar un nivel del marcador con una determinada probabilidad o riesgo puede ser realizada y alcanzada de diferentes maneras. Preferentemente, los valores medidos de los marcadores PCR e IL-6, se combinan matemáticamente y el valor combinado se correlaciona con la cuestión diagnóstica subyacente. Los valores de marcador pueden combinarse mediante cualquier método matemático apropiado del estado de la técnica.

15 Preferentemente, el algoritmo matemático aplicado en la combinación de marcadores es una función logística. El resultado de aplicar dicho algoritmo matemático o dicha función logística preferentemente es un único valor. Dicho valor puede correlacionarse fácilmente con el riesgo de progresión de la enfermedad de la AR. De un modo preferente, dicha función logística se obtiene mediante: a) la clasificación de los pacientes de AR en grupos de pacientes que experimentan progresión de la enfermedad y el grupo de pacientes que no experimenta progresión de la enfermedad, b) la identificación de marcadores que difieren significativamente entre dichos grupos mediante análisis univariante, c) el análisis de regresión logística para evaluar los valores discriminantes independientes de marcadores útiles en la evaluación de la progresión de la enfermedad de la AR, y d) la construcción de la función logística para combinar los valores discriminantes independientes.

25 En una realización preferente, la función logística utilizada para combinar los valores de PCR e IL-6 se obtiene mediante: a) la clasificación de los pacientes de AR en grupos de pacientes que están experimentando progresión de la enfermedad y pacientes que no están experimentando progresión de la enfermedad, respectivamente, b) el establecimiento de los valores de PCR e interleuquina-6, c) la realización de un análisis de regresión logística, y d) la construcción de la función logística para combinar los valores de los marcadores PCR e interleuquina-6.

30 En una realización preferente adicional, la función logística para combinar las mediciones de PCR e IL-6 con los valores de otro u otros marcadores se obtiene mediante: a) la clasificación de los pacientes de AR en grupos de pacientes que están experimentando progresión de la enfermedad y el grupo de pacientes que no está experimentando progresión de la enfermedad, b) la identificación de uno o más marcadores adicionales que diferencie significativamente entre estos grupos mediante análisis univariante, c) la realización de análisis de regresión logística para evaluar si dicho marcador presente un valor discriminante aditivo respecto a la combinación de PCR e interleuquina-6 en la evaluación de la progresión de la enfermedad de la AR, y d) la construcción de la función logística que combina los valores medios de PCR, interleuquina-6 y uno o más marcadores adicionales.

40 Una función logística para correlacionar una combinación de marcadores con una enfermedad preferentemente utiliza un algoritmo desarrollado y obtenido mediante la aplicación de métodos estadísticos como el análisis discriminante (AD) (es decir, el AD lineal, cuadrático, regularizado), los métodos de núcleo (es decir, SVM), los métodos no paramétricos (es decir, los clasificadores del vecino k más próximo), CMP (cuadrados mínimos parciales), los métodos basados en árboles (es decir, la regresión lógica, CART, los métodos de bosque aleatorio, los métodos de "boosting/bagging"), los modelos lineales generalizados (es decir, la regresión logística), los métodos basados en componentes principales (es decir, SIMCA), los modelos aditivos generalizados, los métodos basados en lógica difusa, y los métodos basados en redes neuronales y algoritmos genéticos. El experto en la materia no encontrará difícil la selección de un método estadístico apropiado para evaluar una combinación de marcadores de la presente invención y de esta manera la obtención de un algoritmo matemático apropiado. Preferentemente, el método estadístico utilizado para obtener el algoritmo matemático utilizado al correlacionar la combinación de marcadores de la invención con el riesgo de progresión de la enfermedad de la AR a partir del AD (es decir, el análisis discriminante lineal, cuadrático, regularizado), los métodos de núcleo (es decir, SVM), los métodos no paramétricos (es decir, los clasificadores del vecino k más próximo), CMP (cuadrados mínimos parciales), los métodos basados en árboles (es decir, la regresión lógica, CART, los métodos de bosque aleatorio, los métodos de "boosting") o los modelos lineales generalizados (es decir, la regresión logística). Los detalles referentes a dichos métodos estadísticos se encuentran en las referencias siguientes: Ruczinski I. *et al.*, J. of Computational and Graphical Statistics 12:475-511, 2003; Friedman, J. H., J. of the American Statistical Association 84:165-175, 1989; Hastie T. *et al.*, The Elements of Statistical Learning, Springer Verlag, 2001; Breiman L. *et al.*, Classification and regression trees, California, Wadsworth, 1984; 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. *et al.*, Pattern Classification, Wiley Interscience, 2a edición, 2001.

65 Es una realización preferente de la invención la utilización de un valor de corte multivariante optimizado para la combinación subyacente de marcadores biológicos y la discriminación del estado A del estado B, por ejemplo la progresión de la enfermedad de la AR de la no progresión de la enfermedad de la AR, respectivamente. 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 PCR e IL-6 no mejora significativamente la exactitud diagnóstica en la evaluación del riesgo de progresión de la enfermedad para un paciente que presenta AR.

En el análisis univariante, PCR, IL-6 y algunos otros marcadores presentan un área bajo la curva (ABC) de entre aproximadamente 0,7 y aproximadamente 0,8. Tanto PCR como IL-6 son marcadores de la inflamación y presentan una correlación elevada entre sí. Por lo tanto, es bastante inesperado observar que PCR e IL-6 pueden combinarse y al mismo nivel de especificidad que los marcadores individuales muestran una enorme mejora de la sensibilidad.

El ABC es un indicador del rendimiento o exactitud de un procedimiento diagnóstico. La exactitud de un método diagnóstico se describe mejor con sus características de operador-receptor (COR) (ver especialmente Zweig M.H. y Campbell G., Clin. Chem. 39:561-577, 1993). El gráfico COR es un gráfico de todas las parejas de sensibilidad/especificidad que resultan de modificar continuamente el umbral de decisión en el rango completo de datos observados. El área bajo el gráfico de COR se denomina ABC.

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 del ensayo de distinguir correctamente dos condiciones diferentes de los sujetos investigados. Dichas condiciones son, por ejemplo, salud frente a enfermedad o progresión de la enfermedad frente a no progresión de la enfermedad.

En cada caso, el gráfico COR ilustra el solapamiento entre dos distribuciones mediante el dibujo en un gráfico de la sensibilidad frente a 1-especificidad para el rango completo de umbrales de decisión. En el eje y está la sensibilidad, o la fracción positiva verdadera [definida como (número de resultados de ensayo positivos verdaderos)/(número de resultados positivos verdaderos + número de ensayo falsos negativos)]. Lo anterior también se denomina positividad en presencia de una enfermedad o condición. Se calcula únicamente a partir del subgrupo afectado. En el eje x se encuentra la fracción de falsos positivos o 1-especificidad [definida como (número de resultados falsos positivos)/(número de resultados negativos verdaderos + número de resultados falsos positivos)]. Es un índice de especificidad y se calcula enteramente a partir del subgrupo no afectado. Debido a que las fracciones positivas verdaderas y falsas positivas se calculan enteramente por separado, mediante la utilización de los resultados de ensayo de dos subgrupos diferentes, el gráfico COR es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto en el gráfico COR representa una pareja de sensibilidad/1-especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Un ensayo con perfecta discriminación (ningún solapamiento entre las dos distribuciones de resultados) presenta un gráfico COR que pasa a través de la esquina izquierda superior, en donde la fracción de positivos verdaderos es de 1,0, o 100% (sensibilidad perfecta) y la fracción de falsos positivos es de 0 (especificidad perfecta). El gráfico teórico para un ensayo sin discriminación (distribuciones idénticas de resultados para los dos grupos) es una línea diagonal en 45° desde la esquina inferior izquierda y la esquina superior derecha. La mayoría de gráficos se encuentra entre estos dos extremos. (en el caso de que el gráfico COR se encuentre por completo bajo la diagonal en 45°, lo anterior se remedia 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, más alta será la exactitud global del ensayo.

Una meta conveniente para cuantificar la exactitud diagnóstica de un ensayo de laboratorio es expresar su rendimiento con un único número. La medida global más común es el área bajo el gráfico COR (ABC). Por convención este área siempre es $\geq 0,5$ (en caso contrario, puede invertirse la regla de decisión para que sí lo sea). Los valores están comprendidos entre 1,0 (separación perfecta de los valores de ensayo de los dos grupos) y 0,5 (ninguna diferencia aparente de distribución entre los dos grupos de valores de ensayo). El área no depende únicamente de una parte particular del gráfico, tal como el punto más próximo a la diagonal o la sensibilidad con una especificidad de 90%, sino del gráfico entero. Es una expresión descriptiva cuantitativa de la proximidad de un gráfico COR al gráfico perfecto (área=1,0).

La sensibilidad de ensayo global dependerá de la especificidad requerida para la puesta en práctica del método dado a conocer en la presente memoria. En determinados contextos preferentes una especificidad de 75% puede resultar suficiente y los métodos estadísticos y algoritmos resultantes pueden basarse en este requisito de especificidad. En realizaciones preferentes adicionales, el método utilizado para evaluar el riesgo de progresión de la enfermedad para un paciente que presenta AR se basará en una especificidad de 80%, 85%, o especialmente preferentemente 90% o 95%. Tal como resultará evidente a partir de la sección de Ejemplos, la combinación de marcadores que utiliza PCR e IL-6 a una especificidad de 90% presenta una buena sensibilidad, de aproximadamente 50%. Lo anterior se compara con un error total de aproximadamente 20% y es mejor que el error total alcanzado con enfoques del estado de la técnica basados únicamente en marcadores bioquímicos individuales.

Los niveles de PCR e IL-6 en la sección de ejemplos han sido medidos y establecidos con los procedimientos de ensayo proporcionados en dicha sección. Debe entenderse que diferentes ensayos pueden conducir a diferentes valores de corte. El experto en la materia no encontrará dificultad en establecer dichos valores de corte dependientes del proveedor mediante el seguimiento de los procedimientos descritos de manera general en la presente invención.

La interleuquina-6 (IL-6) es una 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. 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 de fase aguda de proteínas hepáticas y su síntesis es inducida por las citoquinas IL1 y FNT- α . IL-6 normalmente es producido por macrófagos y linfocitos T. La concentración sérica normal de IL-6 es < 5 pg/ml.

Los medios preferentes para detectar biomarcadores como PCR e IL-6 son ensayos de unión específica, 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 prácticas y procedimientos, se resumen en libros de texto relacionados. Son ejemplos de libros de texto relacionados, Tijssen P., en: Practice and theory of enzyme immunoassays, editores R.H. Burdon and v.P.H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam 1990, páginas 221 a 278 y diversos volúmenes de Methods in Enzymology, editores Colowick, S.P. y Caplan, N.O., Academic Press, referidos a métodos de detección inmunológica, especialmente los volúmenes 70, 73, 74, 84, 92 y 121.

IL-6 puede medirse, por ejemplo, mediante un inmunoensayo de tipo competitivo o de tipo sándwich. IL-6 preferentemente se mide en un inmunoensayo de tipo sándwich que se basa esencialmente en un anticuerpo de unión específica a IL-6 que se encuentra directa o indirectamente unido o que es capaz de unirse a una fase sólida, un anticuerpo de unión específica a IL-6 que se marca detectablemente e incubar dichos reactivos bajo condiciones que permiten la unión de los anticuerpos anti-IL-6 a IL-6 en una muestra, separar el anticuerpo detectablemente marcado no unido, determinar la cantidad de anticuerpo marcado unido mediante IL-6 y correlacionar la cantidad de anticuerpo marcado unido con la concentración de IL-6 en la muestra.

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

Un factor de confusión adicional y que complica la evaluación de riesgo de progresión de enfermedad para un paciente que presenta AR es el hecho de que los pacientes en el momento de la vista pueden encontrarse en diferentes estadios de desarrollo de la enfermedad y bajo diversos regímenes de tratamiento. Los inventores de la presente invención pudieron demostrar que la combinación de marcadores observada era predictiva tanto de pacientes todavía no tratados con un fármaco antirreumático como para pacientes ya bajo tratamiento con un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (FARME). Especialmente el último resultado es de gran relevancia, ya que indica que el método dado a conocer en la presente invención puede ser de ayuda en la identificación de aquellos pacientes que no responden o que no responden suficientemente al tratamiento con FARME. En una realización preferente, el método según la presente invención se pone en práctica utilizando una muestra obtenida de un paciente de AR que se encuentra bajo tratamiento con un fármaco antirreumático seleccionado de entre el grupo de fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (FARME). También preferentemente, el método dado a conocer en la presente memoria se pone en práctica utilizando una muestra obtenida de un paciente de AR que no ha sido sometido a tratamiento con un fármaco antirreumático.

Se cree que con la identificación de la combinación de marcadores PCR e IL-6, se ha identificado ahora la combinación de marcadores clave que resulta útil en la evaluación del riesgo de progresión de enfermedad para un paciente que presenta AR. Tal como han demostrado además los inventores, el método de evaluación del riesgo de progresión de enfermedad para un paciente que presenta AR puede mejorarse adicionalmente mediante la combinación de la medición de los dos marcadores clave PCR e IL-6 con parámetros adicionales. En una realización preferente adicional, la presente invención se refiere a un método que comprende las etapas de: a) la obtención de una muestra líquida, b) la medición en dicha muestra de la concentración de tanto la proteína C reactiva (PCR) como la interleuquina-6 y otro u otros marcadores, y c) la correlación de las concentraciones determinadas en la etapa (b) con el riesgo de progresión de la enfermedad, en el que opcionalmente otro u otros marcadores se seleccionan de entre el grupo que consiste de marcadores óseos o cartilagosos, marcadores de líquido sinovial, otros marcadores de inflamación, marcadores genéticos y puntuaciones radiológicas.

En una realización preferente, el otro u otros marcadores utilizados en un método según la presente invención es un marcador óseo o cartilaginoso, preferentemente dicho marcador óseo o cartilaginoso se selecciona de entre el grupo que consiste de PINP, β -CrossLaps, CartiLaps, osteocalcina e TPCI, también resulta preferente que el marcador o marcadores óseos o cartilagosos sean TPCI y/o CartiLaps.

Los tejidos articulares más prominentes son hueso, cartílago y sinovio. Debido a que la artritis reumatoide es una enfermedad destructiva, estos tejidos serán los más afectados. Son una fuente probable de potenciales marcadores biológicos en el campo de la AR. En principio, dichos marcadores pueden proceder 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 óseo, cartilaginoso o sinovial pueden originarse de la síntesis o de la

destrucción de estos tejidos. Los diversos marcadores del metabolismo óseo, cartilaginoso y/o sinovial 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.

5 Entre los marcadores óseos y/o cartilaginosos se incluyen marcadores de ambos marcadores de degradación del colágeno óseo y/o cartilaginoso, así como marcadores de la formación de colágeno óseo y/o cartilaginoso. Los marcadores óseos o cartilaginosos derivados de colágeno preferentes son:

- 10 1. Piridinolina (=PYD), desoxipiridinolina (=DPD) y Glc-Gal-PYD: la piridinolina (=PYD) estabiliza el colágeno mediante entrecruzamiento de las cadenas de la triple hélice del colágeno. La estructura química de la PYD es muy estable y puede encontrarse en el suero y la orina como producto final de la degradación del colágeno (Knott L. y Bailey A.J., Bone 22:181-187, 1998). Se ha asociado 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 liberada del cartílago y sólo en cierto grado del hueso, mientras que su pariente cercano desoxipiridinolina (=DPD) se origina mayoritariamente de hueso. Los tres marcadores han sido asociados a la artritis (Kaufmann, *supra*). La forma glucosilada Glc-Gal-PYD se ha observado mayoritariamente en el tejido sinovial (Gineyts E. *et al.*, Rheumatology 40:315-323, 2001).
- 15 2. Telopéptidos entrecruzados: CTX-I, CTX-II, NTX-I y el epítipo LQ que 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 se conoce como β -CrossLaps® (Bond M. *et al.*, Clin. Chem. 40:2022-2025, 1994).
- 20 3. El telopéptido carboxi-terminal del colágeno de tipo I (=TPCI) se refiere a un fragmento y marcador de colágeno de tipo I que originalmente se deriva del colágeno de tipo I mediante corte con cianobromuro (patente US nº 5.538.853).
- 25 4. 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 (patente US nº 6.372.442).
- 5 5. Aminoácidos modificados: el colágeno comprende aminoácidos como la hidroxiprolina y la galactosil-hidroxilisina, que pueden utilizarse como marcador de la degradación del colágeno (Al-Dehaimi A.W. *et al.*, Clin. Chem. 45:676-681, 1999).
- 30 6. Neopéptidos del colágeno: Col2-3/4 y CIIN son neopéptidos generados por el corte inicial del colágeno II por las collagenasas (Billinghurst, R.C. *et al.*, J. Clin. Invest. 99:1534-1545, 1997).
- 35 7. Los marcadores de colágeno considerados que reflejan la formación de hueso: el propéptido N-terminal así como el propéptido C-terminal del colágeno de tipo I (=PINP y PICP), respectivamente, se cortan del polipéptido precursor (procolágeno) durante/después de la síntesis y se consideran marcadores de la formación de hueso. PIICP es el propéptido correspondiente del colágeno de tipo II, mientras que PIINP se deriva del colágeno III.

También preferentemente, el marcador óseo o cartilaginoso puede ser un marcador no colágeno, tal como: CS846, que es un epítipo condroitín-sulfato creado durante la síntesis de agregano; la proteína de matriz oligomérica del cartílago (=PMOC) que presenta funciones de puente en el cartílago (Saxne T. y Heinegard D., Br. J. Rheumatol. 31:583-591, 1992), la proteína de capa intermedia del cartílago (=PCIC), que es una proteína matricial del cartílago (Lorenzo P. *et al.*, J. Biol. Chem. 273:23463-23468, 1998); las proteínas de matriz del cartílago 1 a 3 también conocidas como matrilineas; las condromodulinas que actúan como moléculas de señalización en el cartílago (Suzuki F., Connect. Tissue Res. 35:303-307, 1996); proteína sensible al ácido retinoico derivada del cartílago (=PAR-DC) o MIA, que presenta una función todavía indefinida en la modulación de los condrocitos (Mueller-Ladner U. *et al.*, Rheumatology 38:148-154, 1999); la osteocalcina, que es sintetizada por los osteoblastos, pertenece a la proteína matricial no colágeno principal del hueso y se utiliza para realizar un 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 matriciales no colágenas mayores del hueso, tales como la sialoproteína ósea II, ahora conocida como sialoproteína ósea, que, por ejemplo, ha sido evaluada como marcador para la renovación ósea (Saxne T. *et al.*, Arthritis Rheum. 38:82-90, 1995).

En una realización preferente, el otro u otros marcadores utilizados en un método según la presente invención es un marcador sinovial seleccionado de entre el grupo que consiste de metaloproteasa de matriz 1 (=pro-MPM-1), metaloproteasa de matriz 3 (=pro-MPM3), ácido hialurónico, preferentemente el otro u otros marcadores sinoviales son ácido hialurónico y/o pro-MPM3.

La familia de metaloproteinasas de matriz (=MPM) degrada prácticamente todos los componentes de la matriz extracelular.

60 Por lo tanto, las MPM han sido asociadas a diversos tipos de cáncer, aunque también a procesos inflamatorios en la AR. MPM1 y MPM3 son producidas por los fibroblastos, osteoblastos y células endoteliales con la estimulación por parte de citoquinas proinflamatorias como IL1 o FNT- α . Generalmente las MPM se observan en la circulación en forma de proforma inactiva, es decir, pro-MPM1 y pro-MPM3, respectivamente. pro-MPM1 y pro-MPM3 han sido detectadas en líquido sinovial de los pacientes de AR y sus niveles son sensibles a la terapia anti-FNT- α . La

metaloproteasa más preferente que debe utilizarse en el panel de marcadores para evaluar el riesgo de progresión de enfermedad para un paciente que presenta AR es pro-MPM3.

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

10 El glucosaminoglicano ácido hialurónico es una de las macromoléculas esenciales para la función de una articulación. Es sintetizado por los fibroblastos y otras células especializadas del tejido conectivo. El ácido hialurónico participa en la formación de la matriz extracelular y en los contactos célula a célula. Se observan concentraciones elevadas en el líquido sinovial, en donde es responsable de la retención del 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 En una realización preferente, el otro u otros marcadores utilizados en un método según la presente invención es un marcador genético seleccionado de entre el grupo que consiste de un alelo HLA-DR4 y un alelo HLA-DRB1, preferentemente el otro u otros marcadores genéticos es un alelo HLA-DRB1*01 y/o un alelo HLA-DRB1*04 (Goronzy J.J. *et al.*, *Arthritis and Rheumatism* 50:43-54, 2004).

25 En una realización preferente, el otro u otros marcadores utilizados en un método según la presente invención es una puntuación radiológica, preferentemente dicha puntuación radiológica se selecciona de entre el grupo que consiste de la puntuación de Sharp, la puntuación de Sharp-Genant, la puntuación de Heijde-Sharp, la puntuación de Ratingen, la puntuación de Larsen, la puntuación de Rau y la puntuación de Herborn; la puntuación o puntuaciones radiológicas preferentes son la puntuación de Sharp-Genant y/o la puntuación de Larsen.

30 La "puntuación de Sharp" fue introducida por primera vez en 1971 (Sharp J.T. *et al.*, *Arthritis and Rheumatism* 14:706-720, 1971) y fue elucidada adicionalmente en 1985 (Sharp J.T. *et al.*, *Arthritis and Rheumatism* 28:1326-1335, 1985).

35 La "puntuación de Sharp-Genant" es una modificación de la puntuación de Sharp propuesta por Genant en 1983 (Genant H.K., *Am. J. Med.* 75:35-47, 1983).

La "puntuación de van der Heijde-Sharp" es una modificación de la puntuación de Sharp propuesta por van der Heijde en 1989 (van der Heijde D.M.F.M., *Lancet* 1:1036-1038, 1989).

40 La "puntuación de Larsen" puede ser introducida por primera vez en 1977 (Larsen A. *et al.*, *Acta Radiol. Diagn.* 18:481-491, 1977). La "puntuación de Rau" en ocasiones denominada "puntuación de Ratingen" es una modificación de la puntuación de Larsen (Rau R. y Wassenberg S., *Z. Rheumatol.* 62:555-565, 2003).

45 En una realización preferente, el otro u otros marcadores utilizados en un método según la presente invención es un marcador adicional de inflamación, preferentemente dicho marcador adicional de inflamación es un marcador de inflamación seleccionado de entre el grupo que consiste de proteínas S100, tasa de sedimentación de eritrocitos (TSE), AAS y selectina-E, preferentemente es AAS y/o selectina-E.

50 La expresión "otro marcador de inflamación" o "marcador adicional de inflamación" se utiliza para indicar que estos marcadores no son ni PCR ni IL-6.

55 El amiloide A sérico (=AAS) es una proteína de fase aguda de bajo peso molecular de 11,7 kDa. Es sintetizada predominantemente por el hígado en respuesta a la estimulación con IL-1, IL-6 o FNT- α y participa en la regulación de la respuesta inmunológica dependiente de las células T. En los sucesos agudos, la concentración de 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, los traumatismos o las infecciones. En la artritis reumatoide se ha utilizado en determinados casos como sustituto de la PCR, aunque la AAS todavía no está tan ampliamente aceptada.

60 Las proteínas S100 forman una familia constantemente creciente de proteínas de unión a 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 van desde la regulación de la fosforilación de las proteínas, de actividades enzimáticas, o de la dinámica del citoesqueleto, hasta la participación en la proliferación y diferenciación celulares. Debido a que algunas proteínas S100 también son liberadas por células, también se han descrito funciones extracelulares, por ejemplo la supervivencia neuronal, la proliferación de los astrocitos, la inducción de apoptosis y la regulación de los procesos inflamatorios. S100A8, S100A9, el heterodímero S100A8/A9 y S100A12 han sido encontrados en la inflamación,

respondiendo S100A8 a la inflamación crónica, mientras que S100A9, S100A8/A9 y S100A12 se encuentran incrementados en la inflamación aguda. S100A8, S100A9, S100A8/A9 y S100A12 se han asociado a diferentes enfermedades con componentes inflamatorios, incluyendo algunos cánceres, rechazo del aloinjerto renal, la colitis y, más importante, con el AR (Burmeister G. y Gallacchi G., *Inflammopharmacology* 3:221-230, 1995; Foell D. *et al.*, *Rheumatology* 42:1383-1389, 2003). Los marcadores S100 más preferentes para la utilización en un panel de marcadores para evaluar la progresión de la enfermedad en la AR según la presente invención son S100A8, S100A9, heterodímero S100A8/A9 y S100A12.

La selectina-sE (molécula 1 de adhesión a leucocitos endoteliales soluble, MALE-1) es una glucoproteína transmembranal de tipo I, de 115 kDa, expresada únicamente sobre las células endoteliales y sólo tras la activación por citoquinas inflamatorias (IL-1 β , FNT- α) o endotoxina. La selectina-E de superficie celular es un mediador de la unión rodante de los leucocitos al endotelio, una etapa esencial en la extravasación de los leucocitos en el sitio de inflamación, desempeñando de esta manera un papel importante en la respuesta inflamatoria localizada. La selectina-E soluble se encuentra en la sangre de individuos sanos, probablemente surgida del corte proteolítico de la molécula expresada en superficie. Se ha informado de niveles elevados de selectina-sE en suero en una diversidad de condiciones patológicas (Gearing A.J.H. *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 667:324-331, 1992).

Preferentemente el otro u otros marcadores utilizados en combinación con PCR e IL-6 con el fin de evaluar el riesgo de progresión de la enfermedad en la AR es un marcador bioquímico o un biomarcador. Preferentemente el biomarcador es un polipéptido o un autoanticuerpo.

Los ejemplos y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención.

Descripción de las figuras

Población de estudio

- Fig. 1 Gráfico de probabilidad acumulada de tasa de progresión 1 para todos los pacientes de AR (eje x=probabilidad acumulada (%); eje y=cambio de la puntuación de Sharp-Genant).
- Figs. 2 a 5 Gráficas de caja y bigote de marcadores individuales o combinaciones de marcadores. Los pacientes de AR del panel I se han clasificado como presentando progresión de la enfermedad o como no presentando progresión de la enfermedad. La especificidad (caja a la derecha en cada figura) se ha fijado en aproximadamente 90% (=0,9 en el eje y). La sensibilidad para cada marcador o combinación de marcadores se muestra en la caja intermedia y el error total correspondiente se muestra mediante el gráfico de caja y bigote a la izquierda. (cajas=cuartiles 25 a 75; bigotes=rango intercuartil de 1,5 veces; en caja=mediana; + indica la posición de la media; *=valor individual fuera de los bigotes).
- Fig. 2 Gráficos de caja y bigotes para la sensibilidad a PCR=35%; error total=23%.
- Fig. 3 Gráficos de caja y bigotes para la sensibilidad a IL-6=35%; error total=25%.
- Fig. 4 Gráficos de caja y bigotes para la sensibilidad a la combinación PCR + IL-6=50%; error total=20%.
- Fig. 5 Gráficos de caja y bigotes para la sensibilidad a la combinación PCR, IL-6 y pro-MPM3=53%; error total=20%.

Se recogieron en cinco centros europeos con un seguimiento de uno o dos años muestras derivadas de 237 pacientes de AR altamente caracterizados con duración máxima de la enfermedad de 15 años. Todos los individuos fueron diagnosticados de pacientes de AR de acuerdo con los criterios revisados de 1987 para la clasificación de la artritis reumatoide de la American Rheumatism Association (Arnett F.C. *et al.*, *Arthritis Rheum.* 31:315-324, 1988). Todos los pacientes fueron documentados con un formulario de informe de caso extensivo (=FIC). El FIC incluía el cuestionario de evaluación de la salud, el cuestionario SF36, el recuento de articulaciones hinchadas y sensibles, parámetros de laboratorio, historia clínica de la cirugía relevante, medicación, comorbilidades y medicación para comorbilidades. Se obtuvieron radiografías de las manos y pies en la línea base, y 1 y 2 años después de un procedimiento estandarizado. Sólo se utilizaron las muestras de línea base obtenidas de los pacientes de AR en la medición de los diferentes analitos y los resultados correspondientes se utilizaron para los análisis univariante y multivariante.

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

Tabla 1:

Colectivo de pacientes de AR	
Número de pacientes de AR	237
Pacientes con todas las radiografías (LB, 1 año, 2 años)	204
Pacientes con radiografías en LB y año 1	33
Edad (media, (mínimo/máximo))	58,6 (18-87)
Distribución de géneros (hombres/mujeres)	84/153
Erosividad en la línea base (erosivo/no erosivo)	155/82

Duración de la enfermedad (media, (mínimo/máximo))	4,9 (0,1-15,2) años
--	---------------------

Ejemplo 2

Determinación de las puntuaciones de Sharp-Genant

5 De cada paciente se realizaron radiografías de las manos y pies en la línea base y tras uno y dos años. La radiografías en película convencional se enviaron a Synarc (Synarc GmbH, Hamburg, Alemania), en donde las películas físicas se digitalizaron utilizando un digitalizador de alta resolución Lumiscan 200. Tras una comprobación de calidad, cada imagen fue leída por un radiólogo experimentado y puntuada según la puntuación de Sharp modificada por Genant.

Puntuación morfológica de las radiografías

15 Se puntuaron las erosiones óseas y estrechamiento del espacio articular de manos y pies siguiendo el esquema de gradación de Sharp modificado por Genant, tal como se indica posteriormente. Este esquema de gradación se basa en la técnica de puntuación de Sharp modificada por Genant.

20 Puntuación de erosión: se puntuaron catorce sitios en cada muñeca y mano (cuatro articulaciones interfalángicas proximales y cinco metacarpofalángicas, la articulación carpometacarpiana del pulgar, el hueso escafoides, el radio distal y la cúbito distal) y seis articulaciones en cada pie (cinco articulaciones metatarsofalángicas y la articulación interfalángica del dedo I (es decir, el dedo gordo), utilizando una escala de ocho puntos de 0 a 3,5 basada en el tamaño de las erosiones y el área de hueso (ambos lados de la articulación) afectado:

- 0 (normal: sin erosiones)
- 25 0,5 (sutil pérdida de continuidad cortical u observaciones ambiguas de erosión ósea)
- 1,0 (leve: erosiones definitivas aunque pequeñas de uno o ambos huesos articulares, habitualmente en las áreas desnudas, afectando a <25% de las superficies articulares)
- 1,5 (leve a moderada: erosiones pequeñas-intermedias que afectan a <25% de las superficies articulares de uno o ambos huesos articulares)
- 30 2,0 (moderada: erosiones intermedias-grandes que afectan aprox. a 26% a 50% de la superficie articular de ambos huesos articulares)
- 2,5 (moderada a grave: erosiones de aprox. 51% a 75% de las superficies articulares)
- 3,0 (grave: erosiones de aprox. 76% a 90% de las superficies articulares)
- 35 3,5 (muy grave: erosiones de 100% de las superficies articulares (destrucción total de las superficies articulares)

40 Puntuación de estrechamiento del espacio articular (EEA). Se puntuaron trece sitios en cada muñeca y mano (articulaciones interfalángicas proximales de los dedos II a V, la articulación interfalángica del pulgar y cinco articulaciones metacarpofalángicas, articulaciones carpometacarpianas de los dedos III a V como una única unidad, el espacio pericarpiano (escafoides-hueso grande y semilunar-hueso grande combinados) y la articulación radiocarpiana) y seis sitios en cada pie (cinco articulaciones metatarsofalángicas y la articulación interfalángica del dedo I (es decir, el dedo gordo)), utilizando una escala de nueve puntos entre 0 y 4:

- 0 (normal)
- 45 0,5 (estrechamiento sutil del espacio articular u observaciones ambiguas)
- 1,0 (leve estrechamiento del espacio articular (focal o menor))
- 1,5 (estrechamiento leve a moderado del espacio articular)
- 2,0 (estrechamiento moderado del espacio articular)
- 2,5 (estrechamiento moderado a grave del espacio articular)
- 50 3,0 (estrechamiento grave del espacio articular)
- 3,5 (estrechamiento grave del espacio articular a anquilosis)
- 4,0 (anquilosis clara)

55 Manos/muñecas: las puntuaciones individuales de cada articulación se suman separadamente para crear una puntuación total de erosión y una puntuación EEA total para las manos/muñecas. La puntuación máxima de erosión total para las manos/muñecas es (14 x 3,5 máximo por cada articulación) x 2 = 98. La puntuación EEA total máxima es (13 x 4 máximo por articulación) x 2 = 104. Para proporcionar el mismo peso a erosiones y estrechamiento del espacio articular, se normaliza cada suma a una escala de 0 a 100. La puntuación E es la suma de las puntuaciones de erosión y la puntuación J es la suma de las puntuaciones EEA para ambas manos, de donde se calculan las puntuaciones normalizadas de la manera siguiente:

$$\text{puntuación E normalizada} = (\text{punt. E} / 98) \times 100,$$

y

$$\text{puntuación J normalizada} = (\text{punt. J} / 104) \times 100.$$

5 Pies: Al igual que para las manos/muñecas, las puntuaciones individuales de cada articulación se suman separadamente para crear una puntuación total de erosión y una puntuación EEA total para los pies. La puntuación de erosión total máxima para los pies es (6 x 3,5 máximo por articulación) x 2 = 42. La puntuación EEA total máxima es (6 x 4 máximo por articulación) x 2 = 48.

10 Con el fin de proporcionar el mismo peso a erosiones y estrechamiento del espacio articular, cada suma se normaliza a una escala de 0 a 45.

La puntuación E es la suma de las puntuaciones de erosión y la puntuación J es la suma de las puntuaciones EEA de ambos pies; las puntuaciones normalizadas se calculan de la manera siguiente:

$$\text{Puntuación E normalizada} = (\text{punt. E} / 42) \times 45,$$

15 y

$$\text{Puntuación J normalizada} = (\text{punt. J} / 48) \times 45.$$

Combinación: la puntuación total para las manos/muñecas y pies es la suma de los totales individuales para cada uno. De esta manera, la puntuación máxima alcanzable es 290.

$$\text{Puntuación de erosión} = \text{punt. E normaliz. manos.}$$

20

$$\text{Puntuación EEA} = \text{punt. J normaliz. manos/muñecas} + \text{punt. J normaliz., pies}$$

$$\text{Puntuación total} = \text{Puntuación Erosión} + \text{Puntuación EEA.}$$

$$\text{Cambio de erosión} = (\text{punt. erosión de seguimiento}) - (\text{puntuación de erosión inicial})$$

$$\text{cambio de EAA} = (\text{punt. EAA de seguim.}) - (\text{puntuación EAA inicial})$$

$$\text{Cambio total} = (\text{punt. total de seguimiento}) - (\text{punt. total inicial}).$$

25 Ejemplo 3

Clasificación de los pacientes de AR con progresión de la enfermedad y de AR sin progresión de la enfermedad

30 Se comentan algunas posibilidades en la literatura de clasificación de progresión de la enfermedad. Aparte de los criterios ACR y EULAR, utilizados mayoritariamente en estudios farmacéuticos para evaluar la respuesta de tratamiento, también puede utilizarse la puntuación HAQ y las puntuaciones radiológicas para la clasificación de la progresión de la enfermedad. La metodología más preferente es la utilización del cambio de cualquier puntuación radiológica tras un año. Los presentes inventores decidieron utilizar la puntuación de Sharp-Genant total y determinar el cambio individual de esta puntuación uno o dos años después del valor de línea base (=tasa de progresión).

35 **Tasa de progresión (1) = cambio de punt. de Sharp-Genant (PSG) respecto a línea base hasta el año 1.**

Tasa de progresión (2) = cambio de punt. de Sharp-Genant (PSG) respecto a línea base hasta el año 2.

40 La siguiente etapa importante es definir un valor corte para las tasas de progresión para poder clasificar los pacientes de AR con progresión separándolos de los de AR sin progresión. Por lo tanto, se dibujó un gráfico de probabilidad acumulada de la tasa de progresión 1 o 2 de todos los pacientes (ver la figura 1) (van der Heijde *et al.*, *Arthritis Rheum.* 52:49-60, 2005). Aplicando una línea recta a la primera pendiente de la gráfica se determinó el punto de intersección a una tasa de progresión (1) de "5". Se obtuvieron los mismos resultados utilizando un gráfico de probabilidad de la tasa de progresión (2). La utilización de una tasa de progresión de "5" (es decir, un incremento

de la PSG superior a 5 al año) como valor de corte para la clasificación de los pacientes de AR en pacientes con y sin progresión se basa en los dos argumentos siguientes:

1. Al utilizar una tasa de progresión (1) de "5" como valor de corte, aprox. 20% de los pacientes de AR de este colectivo de muestra se clasificarán como pacientes de AR con progresión.
2. El valor de cualquier método de puntuación utilizado para medir un resultado clínico depende de su fiabilidad. Se describen diferentes métodos para la determinación de la "sensibilidad al cambio" (Boini S. y Guillemín F., Ann. Rheum. Dis. 60:817-827, 2001). La mejor puntuación de fiabilidad para la clasificación de los pacientes individuales es la diferencia detectable mínima (DDM). Los expertos que han evaluado las radiografías utilizadas para establecer una PSG determinaron una DDM de 5,1 para Lo anterior implica que un cambio de la PSG de aproximadamente 5 es la diferencia mínima de un paciente en dos puntos temporales que puede discriminarse significativamente.

Por lo tanto, se utilizó la clasificación siguiente:

Tasa de progresión (1) o (2) > 5: paciente de AR con enfermedad progresiva

Tasa de progresión (1) o (2) ≤ 5: paciente de AR sin enfermedad progresiva

utilizando esta definición los presentes inventores llegaron a la clasificación siguiente:

pacientes de AR con progresión de la enfermedad:
59 pacientes

pacientes de AR sin progresión de la enfermedad:

178 pacientes

Marcadores medidos

La Tabla 2 representa los ensayos utilizados y proporciona el formato de ensayo, así como los proveedores de los ensayos. La mayoría de los ensayos eran ELISA de formato de placa de microtitulación manual (=PMT). Se determinó el FR y la PCR en un formato de ensayo homogéneo en un analizador Hitachi automático. Se determinaron todas las concentraciones de marcadores en muestras de suero con la excepción de CartiLaps, que se midió en orina. Se normalizaron los valores de CartiLaps con los resultados de creatinina.

Tabla 2:

Ensayos y proveedores		
Biomarcador	Tipo / formato de ensayo	Origen
Anti-PCC	ELISA de tipo sándwich, PMT	Axis-Shield, Dundee (Reino Unido)
PCR	Ensayo homogéneo, Hitachi	Roche Diagnostics, Mannheim (FRG)
Ácido hialurónico	ELISA de tipo sándwich, PMT	Chugai, Tokyo (J)
IL-6	ELISA de tipo sándwich, PMT	Roche Diagnostics, Mannheim (FRG)
FR	Ensayo homogéneo, Hitachi	Roche Diagnostics, Mannheim (FRG)
AAS	ELISA de tipo sándwich, PMT	Biosource, Nivelles (B)
pro-MPM-3	ELISA de tipo sándwich, PMT	The Binding Site, Birmingham (Reino Unido)
S100 A8/A9	ELISA de tipo sándwich, PMT	Bühlmann Lab., Allschwill (CH)
S100 A12	ELISA prototipo, PMT	Roche Diagnostics, Penzberg (FRG)
Osteocalcina	ELISA de tipo sándwich, Elecsys®	Roche Diagnostics, Mannheim (FRG)
β-Crosslaps	ELISA de tipo sándwich, Elecsys®	Roche Diagnostics, Mannheim (FRG)
PINP	ELISA de tipo sándwich, Elecsys®	Roche Diagnostics, Mannheim (FRG)
SCD14	ELISA de tipo sándwich, PMT	IBL, Hamburg (FRG)
CartiLaps	ELISA comp., PMT	Nordic Bioscience, Herlev (Dinamarca)
TPCI	ELISA comp., PMT	Orion Diagnostika, Espoo (FIN)
Selectina-sE	ELISA de tipo sándwich, PMT	R&D Systems, Minneapolis (USA)

Ejemplo 5

Análisis univariante

Las muestras de línea base de la totalidad de los 237 pacientes de AR se midieron con los 16 marcadores listados en la Tabla 2. Cada valor de marcador se transformó logarítmicamente y se llevó a cabo un análisis de COR. La Tabla 3 representa los valores de ABC y la sensibilidad (a una especificidad de 90%) de cada marcador.

5

Tabla 3:

Análisis univariante		
Biomarcador	ABC (%)	Sensibilidad (%) a una especificidad de 90%
Anti-PCC	59	5
PCR	75	37
Ácido hialurónico	70	20
IL-6	77	32
FR	67	24
AAS	70	27
pro-MPM-3	72	31
S100 A8/A9	70	29
S100 A12	68	32
Osteocalcina	50	8
β -CrossLaps	57	7
PINP	55	10
sCD14	61	17
CartiLaps	71	19
TPCI	71	19
Selectina-sE	67	20

8 marcadores alcanzaron una ABC de 70% y superior. PCR mostró la mejor sensibilidad, con 37% a una especificidad de 90%. Resultó muy inesperado que anti-PCC, publicado como un factor pronóstico, mostrase sólo una ABC de 0,59. En muchos artículos científicos los biomarcadores con un cociente de probabilidades de aproximadamente 3,0 y superior se consideraban, de manera bastante optimista, factores predictivos de progresión. Por ejemplo, Syversen S.W., et. al. (Ann. Rheum. Dis. 65, supl. II:110, 2006) informaron de que anti-PCC (CP = 4,18), FR-IgM (CP = 3,12), TSE (CP = 3,73) y sexo femenino (CP = 3,29) son factores predictivos independientes de progresión radiográfica a 10 años en pacientes de AR. Los presentes inventores calcularon el cociente de probabilidades de anti-PCC (valor de corte > 5 U/ml) en su colectivo de AR, obteniendo un cociente de probabilidades similar, es decir, un CP de 4,6. Sin embargo, un cociente de probabilidades de "4" o "5" simplemente no presenta valor diagnóstico en la rutina clínica, en donde se requiere una elevada especificidad (correspondiente a un número bajo de resultados falsos positivos).

10

15

Ejemplo 6

20

Análisis multivariante

Debido al limitado número de pacientes de AR con progresión, una división aleatoria del colectivo de pacientes en un grupo de entrenamiento y un grupo de ensayo no resultó posible. Por lo tanto, se llevó a cabo una validación cruzada externa (VCE). Para la VCE, el grupo de entrenamiento se subdividió 50 veces (proporción 2(subgrupos de entrenamiento): 1(subgrupos de ensayo)) para una validación cruzada de Monte-Carlo (Dudoit S. y van der Laan, M.J., Statistical Methodology 2:131-154, 2005). En los subgrupos de entrenamiento se desarrolló un algoritmo de clasificación y en los subgrupos de ensayo independientes se validó el algoritmo.

25

30

Los algoritmos de clasificación se generaron con 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 utilizan alternativas a las estimaciones habituales (enchufables) de máxima probabilidad para las matrices de covarianza. Estas alternativas se caracterizan mediante dos parámetros (λ , γ), los valores de los cuales se personalizan a la situación individual minimizando conjuntamente una estimación basada en las muestras de futuro riesgo de clasificación errónea (Friedman J.H., J. of the American Statistical Association 84:165-175, 1989). Como método alternativo, pueden ajustarse algoritmos de máquinas de vector soporte (Hastie T. et al., The Elements of Statistical Learning, Springer Series in Statistics, 2001) con resultados de clasificación comparables.

35

40

Los paneles de marcadores se construyeron por pasos partiendo del mejor marcador individual para el problema de clasificación y finalizando cuando el error de clasificación total ya no cambiaba notablemente. Con el fin de obtener distribuciones centralizadas, se transformó cada marcador individual con la función logarítmica natural.

45

Ejemplo 7

Identificación de un panel de marcadores para evaluar el riesgo de progresión de enfermedad de los pacientes de AR

5 El objetivo del análisis multivariante era encontrar un panel de marcadores que mostrase una sensibilidad más alta que el mejor marcador individual. Se fijó el límite de especificidad en 90%. El primer marcador seleccionado fue PCR, con una sensibilidad de 35%, y el segundo fue IL-6, que mejoraba la sensibilidad a 50%. Existen algunas otras combinaciones con diferentes marcadores como tercer y cuarto marcadores, que son capaces de minimizar el error total y/o mejorar la sensibilidad (Tabla 4). Para todas estas combinaciones de marcadores, los dos marcadores más importantes con PCR e IL-6, representando de esta manera los marcadores clave de estos paneles de marcadores.

15 El objetivo de la presente invención es ayudar al reumatólogo en su evaluación de si un paciente de AR está en riesgo de progresión de la enfermedad. El valor diagnóstico del panel de marcadores identificado se refleja mejor en la Tabla 4 con el error total de la clasificación. PCR, actualmente un marcador biológico individual utilizado para la estimación de la inflamación, proporciona un error total de 0,228. IL-6 como marcador individual también revela un error total similar, de 0,247. La combinación preferente de PCR e IL-6 mejora significativamente la clasificación, reduciendo el error total a 0,203. La adición de un tercer y un cuarto marcador finalmente ayuda a minimizar adicionalmente la clasificación incorrecta (error total: 0,196). La sensibilidad alcanzada de 50% sugiere que basándose en el método dado a conocer en la presente memoria, aproximadamente la mitad de los pacientes de AR con enfermedad progresiva pueden ser correctamente identificados con marcadores bioquímicos medidos en un único punto temporal, es decir, en la línea base, lo que no era posible hasta ahora. Se espera que la presente clasificación ayude al reumatólogo en el proceso de decisión, por ejemplo para iniciar un tratamiento utilizando los FARME o para cambiar a un mejor esquema terapéutico utilizando una combinación de diferentes FARME.

25 Tabla 4:

Resultados de la clasificación de los pacientes de AR con progresión de la enfermedad frente a aquellos con AR sin progresión de la enfermedad				
nº de marcadores	marcador o panel de marcadores	VCE (50 veces)		
		ERROR TOTAL	sensibilidad pos. verdaderos	especificidad neg. verdaderos
1	PCR	0,228	35,0%	91,5%
1	IL-6	0,247	35,0%	88,1%
2	PCR, IL-6	0,203	50,0%	91,5%
3	PCR, IL-6, S100 A8/A9	0,203	52,5%	89,8%
3	PCR, IL-6, pro-MPM-3	0,203	55,0%	89,8%
4	PCR, IL-6, S100 A8/A9, selectina-sE	0,196	55,0%	89,8%

Los gráficos de caja y bigotes para los marcadores PCR e IL-6 y las combinaciones de marcadores (PCR, IL-6 y PCR + IL-6 + pro-MPM3), respectivamente, de la Tabla 4 se muestran en las figuras 2 a 5.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método *in vitro* para ayudar en la evaluación del riesgo de progresión de la enfermedad para un paciente que presenta artritis reumatoide (AR), comprendiendo el método las etapas de:

10 a) medir en una muestra líquida la concentración de tanto la proteína C reactiva (PCR) como la interleuquina-6, y opcionalmente de otro u otros marcadores, b) combinar matemáticamente los valores medidos en la etapa a) y c) correlacionar el valor combinado determinado en la etapa b) con el riesgo de progresión de la enfermedad, en el que dicho método de combinación matemática de los valores en la etapa (b) se selecciona de entre AD (es decir, análisis discriminante lineal, cuadrático, regularizado), métodos de núcleo (es decir, SVM), métodos no paramétricos (es decir, clasificadores del vecino k más próximo), CMP (cuadrados mínimos parciales), métodos basados en árboles (es decir, regresión lógica, CART, métodos de bosque aleatorio, métodos de "boosting") o modelos lineales generalizados (es decir, regresión logística).

15 2. Método según la reivindicación 1, en el que el paciente de AR se encuentra bajo tratamiento con un fármaco antirreumático seleccionado de entre el grupo de fármacos antirreumatoides modificadores de enfermedad (FARME) durante la realización de la evaluación.

20 3. Método según la reivindicación 1, en el que opcionalmente se selecciona otro u otros marcadores de entre el grupo que consiste de marcadores óseos o cartilagosos, marcadores de líquido sinovial, otros marcadores de inflamación, marcadores genéticos y puntuaciones radiológicas.

25 4. Método según la reivindicación 3, en el que se seleccionan uno o más marcadores óseos o cartilagosos de entre el grupo que consiste de PINP, β -CrossLaps, CartiLaps, osteocalcina y PTCI.

5 5. Método según la reivindicación 3, en el que el marcador o marcadores sinoviales se seleccionan de entre el grupo que consiste de ácido hialurónico y pro-MPM3.

30 6. Método según la reivindicación 3, en el que el marcador o marcadores genéticos se seleccionan de entre el grupo que consiste de los alelos HLA-DR4 y HLA-DRB1.

35 7. Método según la reivindicación 3, en el que la puntuación o puntuaciones radiológicas se seleccionan de entre el grupo que consiste de la puntuación de Sharp, la puntuación de Sharp-Genant, la puntuación de van der Heijde-Sharp, la puntuación de Ratingen, la puntuación de Larsen y la puntuación de Rau.

8. Método según la reivindicación 3, en el que otro marcador o marcadores de inflamación se seleccionan de entre el grupo que consiste de AAS y selectina E.

Fig. 1

Gráfico de probabilidad acumulada de cambio respecto a la línea base tras 1 año, n=240

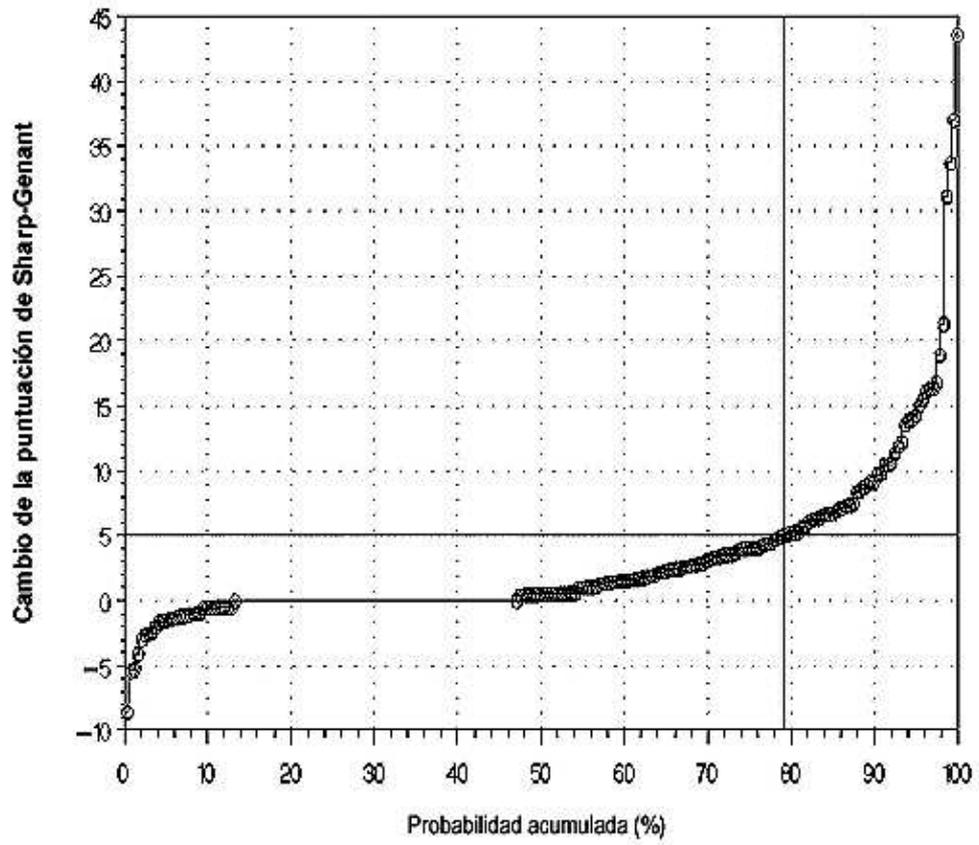


Fig. 2

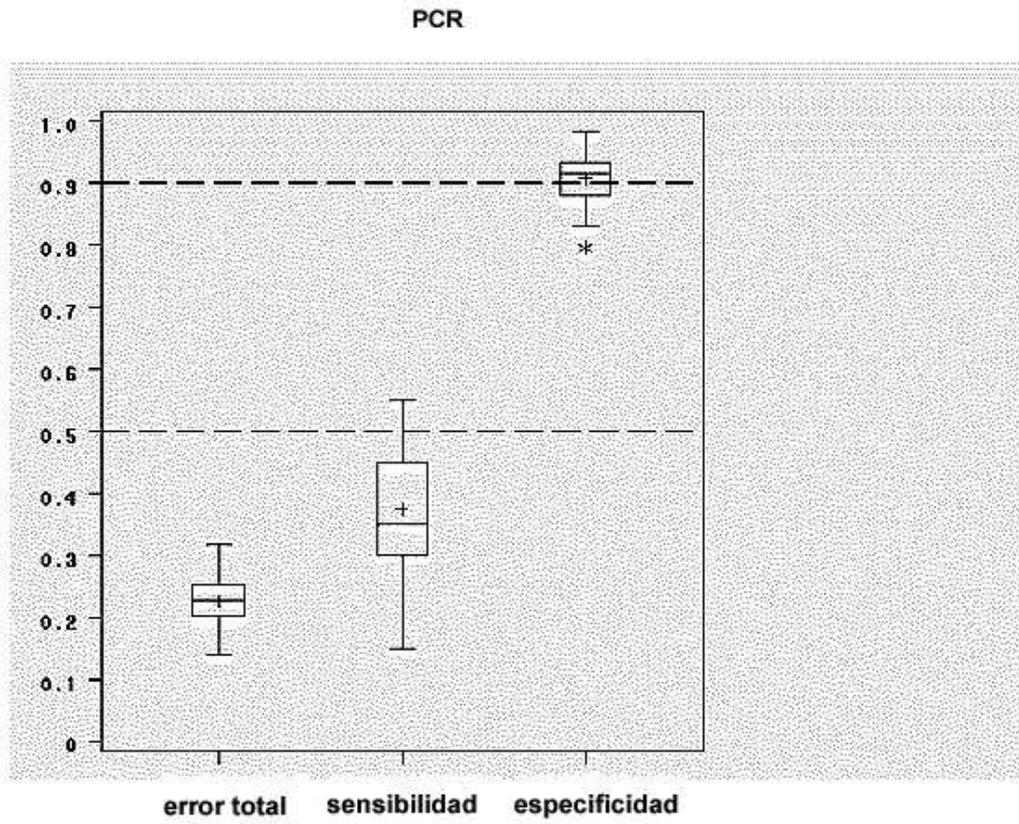


Fig. 3

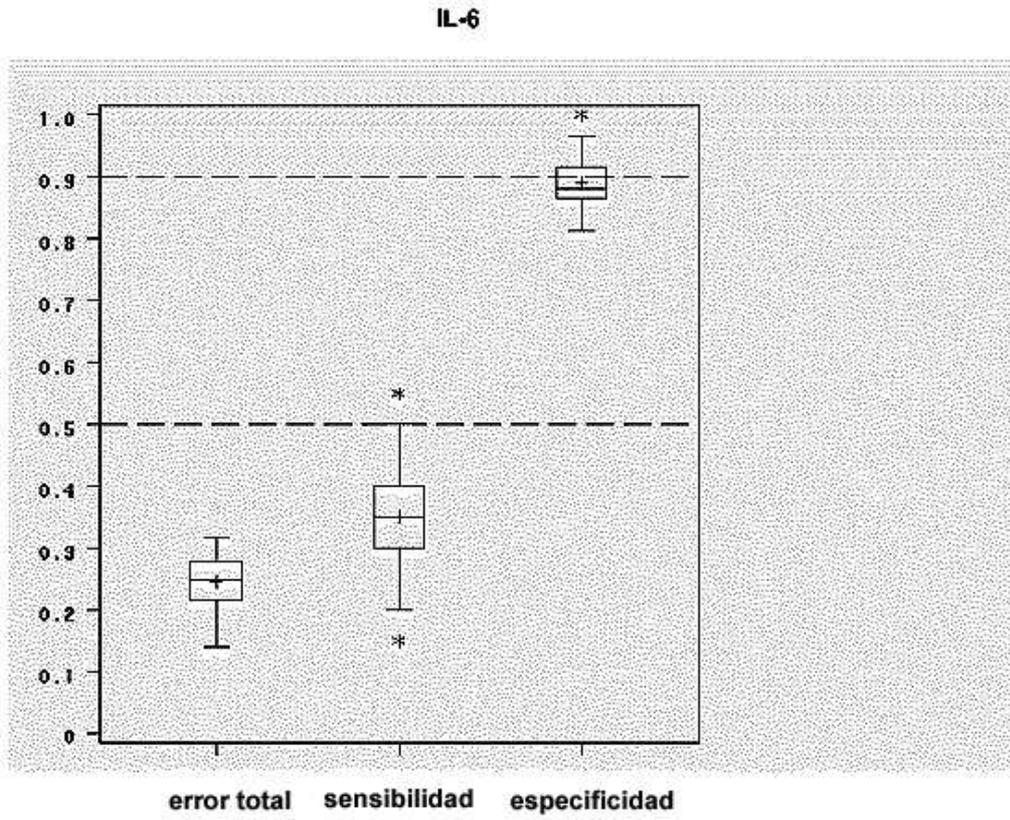


Fig. 4

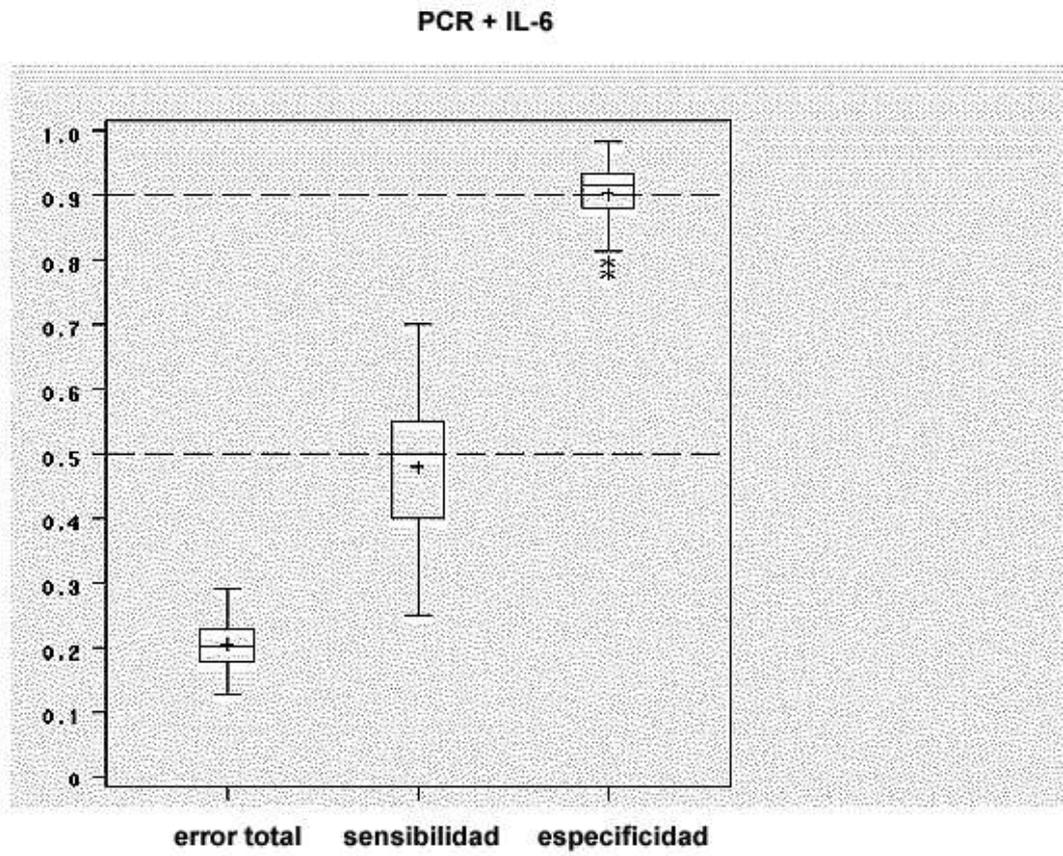


Fig. 5

