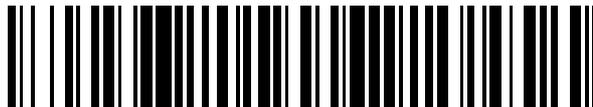


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 558**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/564** (2006.01)

**G01N 33/573** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2011 E 11769677 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2558863**

54 Título: **Composiciones y métodos para caracterizar una miopatía**

30 Prioridad:

**09.08.2010 US 371798 P**

**16.04.2010 US 324857 P**

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

**27.01.2016**

73 Titular/es:

**THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (100.0%)  
3400 North Charles Street  
Baltimore, MD 21218, US**

72 Inventor/es:

**CASCIOLA-ROSEN, LIVIA, ANGELA;  
CHRISTOPHER-STINE, LISA;  
MAMMEN, ANDREW y  
ROSEN, ANTONY**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 557 558 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 caracterizar una miopatía

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

5 Los adultos con debilidad muscular proximal, elevados niveles de creatina quinasa (CK), rasgos de miopatía en la electromiografía (EMG) y evidencia de edema muscular en la formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) tienen un amplio diagnóstico diferencial que incluye miopatías autoinmunes, miopatías tóxicas, miopatías paraneoplásicas y distrofias musculares. La miopatía es un efecto secundario adverso frecuente que se produce en sujetos a los que se administraron estatinas para reducir su colesterol. El dolor muscular experimentado por estos  
10 pacientes es a veces lo suficientemente grave como para justificar la finalización del tratamiento con estatinas. Es crucial distinguir entre las miopatías inmunomediadas y otras etiologías, dado que sólo las enfermedades musculares autoinmunes responden rutinariamente a una terapia inmunosupresora.

15 En muchos casos, los rasgos clínicos distintivos y/o una biopsia muscular pueden proporcionar un diagnóstico definitivo. Por ejemplo, la atrofia perifascicular es patognomónica de la dermatomiositis (DM), incluso en ausencia de erupción; una miopatía vacuolar en un paciente tratado con colchicina sugiere fuertemente una miopatía tóxica, y la tinción de distrofina reducida en el músculo de un hombre joven con la hipertrofia de la pantorrilla es de diagnóstico para una distrofinopatía.

20 Sin embargo, en un número considerable de casos, las muestras de biopsia muscular muestran fibras musculares en degeneración y necróticas en ausencia de rasgos específicos de las enfermedades. En estos casos, la presencia de auto-anticuerpos específicos para la miositis (MSAs) puede identificar el trastorno como perteneciente a la familia de miopatías autoinmunes. Por ejemplo, pacientes con anticuerpos dirigidos contra la partícula de reconocimiento de señal (SRP) tienen típicamente una grave miopatía necrotizante que responde solamente a la inmunosupresión muy agresiva. Desafortunadamente, la evaluación clínica y ensayos de diagnóstico disponibles en la actualidad no siempre proporcionan un diagnóstico definitivo, y puede que no sea posible determinar si una miopatía necrotizante es inmunomediada. Esta incertidumbre puede conducir a un tratamiento insuficiente de las miopatías autoinmunes o  
25 a una inmunosupresión inadecuada en pacientes que no tienen una enfermedad inmunomediada. En suma, los métodos clínicos actuales son inadecuados para diagnosticar enfermedades musculares específicas en pacientes que experimentan miopatías y se requieren con urgencia métodos mejorados.

Hengstmann et al. describe la asociación de anticuerpos anti-SRP del suero con una miopatía necrotizante (Hengstmann GJ, et al., Ann Rheum Dis, 2006; 65:1635-8).

30 La siguiente técnica anterior, publicada después de una o las dos fechas prioritarias de la presente solicitud, describe anticuerpos que caracterizan una miopatía:  
Christopher-Stine et al., Arthritis & Rheumatism, 23 de mayo de 2010  
A.L. Mammen et al., Arthritis & Rheumatism, 01 de marzo de 2011.

**SUMARIO DE LA INVENCION**

35 Tal como se describe a continuación, la presente invención presenta métodos para diagnosticar una miopatía necrotizante inmunomediada en un sujeto.

40 La invención se refiere a un método in vitro para diagnosticar una miopatía necrotizante inmunomediada en un sujeto mamífero, determinando la presencia de auto-anticuerpos específicos para una proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR) o un fragmento de la misma que tiene actividad de unión al auto-anticuerpo anti-HMGCR en el sujeto, que comprende las etapas de:

- a) realizar un inmunoensayo, poniendo en contacto una muestra biológica obtenida del sujeto con una proteína HMGCR o un fragmento de la misma que tiene actividad de unión al auto-anticuerpo anti-HMGCR,
- 45 b) detectar la presencia de auto-anticuerpos en la muestra que específicamente unen la proteína HMGCR o un fragmento de la misma que tiene actividad de unión al auto-anticuerpo anti-HMGCR, en donde la presencia de auto-anticuerpos que específicamente unen la proteína HMGCR o un fragmento de la misma que tiene actividad de unión al auto-anticuerpo anti-HMGCR es indicativa de que el sujeto tiene la miopatía.

- 5 Se describe un método para determinar si la terapia con estatinas debe ser continuada en un sujeto, comprendiendo el método someter a ensayo la presencia de un auto-anticuerpo que reconoce una proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR) en una muestra biológica del sujeto, en donde la identificación del auto-anticuerpo indica que debe interrumpirse la terapia con estatinas. En una realización, la ausencia del auto-anticuerpo en un sujeto identificado como que tiene dolor muscular indica que la terapia con estatinas se puede continuar mientras que el sujeto es vigilado periódicamente en cuanto al desarrollo del auto-anticuerpo. En otra realización, la identificación del auto-anticuerpo en un sujeto que tiene dolor y debilidad muscular indica que debe interrumpirse la terapia con estatinas y que debe iniciarse la terapia inmunosupresora.
- 10 Se describe un método para vigilar la terapia con estatinas en un sujeto, comprendiendo el método someter a ensayo periódicamente una muestra biológica del sujeto en cuanto a un auto-anticuerpo que reconoce una proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR) en una muestra biológica del sujeto. En una realización, el ensayo periódico se lleva a cabo a los 3, 6, 9, 12, 24 y/o 36 meses después del inicio de la terapia con estatinas. En otra realización, el método comprende, además, identificar que el sujeto tiene dolor o debilidad muscular posterior al inicio de la terapia con estatinas.
- 15 Se describe un método de seleccionar un régimen de tratamiento para un sujeto identificado como que tiene una miopatía, comprendiendo el método detectar en una muestra biológica del sujeto un auto-anticuerpo que reconoce una proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR), en el que la detección del auto-anticuerpo indica que debería seleccionarse una terapia inmunosupresora. En una realización, el método comprende, además, identificar que el sujeto tiene dolor y debilidad muscular. En otra realización, la muestra biológica es una muestra biológica líquida o una muestra de tejido. En otra realización, la muestra biológica líquido es sangre, suero o plasma. En otra realización, se detecta el auto-anticuerpo en un inmunoensayo (p. ej., un ELISA, inmunoprecipitación, ensayo de inmunosorbente fluorescente, ensayo de inmunosorbente ligado a compuesto químico, radioinmunoensayo, inmunotransferencia, ensayo inmunométrico, citometría de flujo, transferencia western o inmunohistoquímica).
- 20 Se describe, además, un método para la caracterización de una miopatía en un sujeto, comprendiendo el método poner en contacto una proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR) o fragmento de la misma con suero, sangre o plasma de un sujeto, y detectar la unión específica de un auto-anticuerpo a la HMGCR o fragmento de la misma, caracterizando de esta manera una miopatía en un sujeto. En una realización, la proteína HMGCR o fragmento de la misma se fija a un sustrato. En otra realización, el sustrato es una membrana, una perla o un microchip. En otra realización, la unión es la detección utilizando un ensayo colorimétrico o radiactivo.
- 25 Se describe un kit para la caracterización de una miopatía en un sujeto, comprendiendo el kit una proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR) o fragmento de la misma fijado a un sustrato. En una realización, el kit comprende, además, instrucciones para el uso del kit en un método de cualquier aspecto previo. En una realización, el sustrato es una membrana, una perla o un microchip. En otra realización, la unión es la detección utilizando un ensayo colorimétrico. En otra realización, el fragmento de HMGCR comprende un fragmento C-terminal que comprende 340-888 aa (aminoácidos).
- 30 En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores o de cualquier otro aspecto, el método implica, además, detectar en una muestra biológica del sujeto una proteína de 100 kD y/o una proteína de 200 kD que une un anticuerpo de HMGCR. En determinadas realizaciones de los aspectos anteriores, la proteína es detectada por inmunoprecipitación. En otras realizaciones de los aspectos anteriores, la unión del anticuerpo de HMGCR a la proteína de 100 kD y/o 200 kD se detecta en un ensayo colorimétrico o radiactivo. Todavía en otras realizaciones, la miopatía es una miopatía inmunomediada o miopatía necrotizante asociada con la terapia con estatinas. Todavía en otras realizaciones, el método implica, además, caracterizar la resistencia muscular proximal, el edema muscular en la MRI bilateral del muslo, los niveles de creatina quinasa y/o hallazgos miopáticos por electromiografía. En todavía otras realizaciones, el método implica detectar un marcador seleccionado del grupo que consiste en auto-anticuerpos anti-sintetasa, auto-anticuerpos de la partícula de reconocimiento anti-señal (SRP), niveles elevados de creatina quinasa (CK), infiltrados marcados de células inflamatorias en la biopsia muscular, vacuolas ribeteadas, atrofia perifascicular, MHC positivo de clase I, deposición del complejo de ataque a la membrana en pequeños vasos sanguíneos perimisiales y tinción de anticuerpos anti-NCAM de fibras musculares regenerantes. En todavía otras realizaciones, la detección implica comparar el nivel de auto-anticuerpos en una muestra del sujeto a un nivel de referencia (p. ej., el nivel medio presente en un grupo de controles normales). En determinadas realizaciones de los aspectos anteriores, la detección de un aumento en la desviación estándar de aproximadamente 2-5 en el nivel del auto-anticuerpo que reconoce la proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR) en relación con una referencia es indicativa de miopatía autoinmune asociada a estatinas. En otras realizaciones, la detección de un aumento de la desviación estándar de aproximadamente 3 en el nivel del auto-anticuerpo es indicativa de la miopatía autoinmune asociada a estatinas. En aún otras realizaciones de los aspectos anteriores, el método

comprende, además, identificar que el sujeto tiene dolor y debilidad muscular. En todavía otras realizaciones, la muestra biológica es una muestra biológica líquida o una muestra de tejido. En otras realizaciones, la muestra biológica líquida es sangre, suero o plasma. En otras realizaciones, se detecta el autoanticuerpo en un inmunoensayo (p. ej., un ELISA, inmunoprecipitación, ensayo de inmunosorbente fluorescente, ensayo de inmunosorbente ligado a compuesto químico, radioinmunoensayo, inmunotransferencia, ensayo inmunométrico, citometría de flujo, transferencia western o inmunohistoquímica). En determinadas realizaciones de los aspectos anteriores, el fragmento de HMGR comprende un fragmento C-terminal que comprende 340-888 aa.

Se describen métodos para la caracterización de miopatía, en particular miopatías asociadas con la terapia con estatinas. Se aislaron composiciones y artículos descritos o manufacturados de otra manera en relación con los ejemplos proporcionados a continuación. Otros rasgos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada y de las reivindicaciones.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 incluye una autorradiografía que muestra proteínas inmunoprecipitadas a partir de extractos de células HeLa por parte de sueros de pacientes que tienen una miopatía necrotizante. La inmunoprecipitación de proteínas de ~ 200 kd y ~ 100 kd por parte de sueros de pacientes con una miopatía necrotizante. Sueros de pacientes se utilizaron para inmunoprecipitar proteínas marcadas radiactivamente a partir de extractos de células HeLa que habían sido incubados con <sup>35</sup>S-metionina. Las proteínas inmunoprecipitadas se separaron mediante electroforesis en geles de dodecil-sulfato de sodio-poliacrilamida al 10%. Los paneles de la izquierda y la derecha muestran autorradiografías de dos experimentos separados; los resultados mostrados en el panel de la derecha son de una sola autorradiografía que se ha recortado entre las pistas 7 y 8 para excluir inmunoprecipitaciones que son irrelevantes para el estudio actual. Los números en la parte superior de las pistas 1-4 y 6-9 son números de pacientes. Los sueros de dos sueros control normales (Cont 33 y Cont 35) se utilizaron para las inmunoprecipitaciones mostradas en las pistas 5 y 10. Las puntas de flecha en el lado izquierdo señalan bandas de proteínas de ~ 200-kD y ~ 100-kD. Los valores en el extremo derecho indican las posiciones de los patrones de marcadores de peso molecular.

Figuras 2A y 2B incluyen fotomicrografías que muestran la morfología capilar de muestras de biopsia muscular obtenidas de un donante normal (Figura 2A) y un paciente (paciente 8024) con auto-anticuerpos anti-200/100 (Figura 2B). Las muestras fueron teñidas con anti-CD31, un marcador de células endoteliales. Las flechas indican capilares endomisiales con rasgos morfológicos normales en la muestra de control (Figura 2A) y aquellos con paredes engrosadas y lúmenes dilatados en el paciente con auto-anticuerpos anti-200/100 (Figura 2B). Estas muestras de biopsias se procesaron de manera simultánea en condiciones idénticas (aumento original x 40).

Las Figuras 3A-3D incluyen fotomicrografías que muestran la deposición de complejos de ataque a la membrana en pequeños vasos sanguíneos y miofibras no necróticas. La sección en serie de una muestra de biopsia muscular obtenidos de un paciente anticuerpo anti-200/100 positivo con miopatía necrotizante (paciente 8076). La tinción con anti-complejo de ataque a la membrana (Figura 3A) o hematoxilina y eosina (Figura 3B) demostró un vaso sanguíneo perimisial con acusada deposición del complemento. La Figura 3C es una muestra de biopsia muscular obtenida de un paciente anticuerpo anti-200/100 positivo (paciente 8024) que muestra la deposición del complejo de ataque a la membrana de fibras no necróticas dispersadas. La Figura 3 muestra una vista a mayor aumento del campo mostrado en la Figura 3C. En la Figura 3D las flechas indican la ausencia de la tinción de capilares endomisiales mediante un complejo de ataque a la membrana. Los asteriscos en las Figuras 3C y 3D muestran miofibras apareantes. (Aumento original X 40 en las Figuras 3A, 3B y 3D; X 20 en la Figura 3C. Los asteriscos en las Figuras 3C y 3D marcan la misma miofibra.

Las Figuras 4A-C incluyen fotomicrografías que muestran la deposición del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I sobre fibras no necróticas en muestras de biopsia obtenidas de pacientes auto-anticuerpos anti-200/100 positivos. La Figura 4A muestra la tinción de anticuerpos anti-MHC de clase I de los capilares endomisiales de músculo humano normal (flecha), pero no el sarcolema. Las Figuras 4B y 4C muestran la tinción de anticuerpos anti-MHC de clase I de los capilares endomisiales de músculo humano normal (flecha), pero no el sarcolema, el sarcolema de fibras musculares dispersas en 2 pacientes con auto-anticuerpos anti-200/100 (asteriscos individuales). El citoplasma de una fibra anticuerpos-positiva anti-200/100 también teñido con anti-MHC de clase I (asteriscos dobles); esto probablemente representa una fibra regenerante. Estas muestras de biopsia se procesaron simultáneamente en condiciones idénticas. (Aumento original X 40).

Las Figuras 5A y 5B son auto-radiografías (Figura 5A) que muestra la expresión sobre-regulada de los auto-antígenos de 200-kD y 100-kD por parte de estatinas y (Figura 5B) la identificación del auto-antígeno de 100-kD

5 como 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa). Lisados radiomarcados generados a partir de células HeLa tratadas durante veinticuatro horas en ausencia (pista 1) o presencia (pista 2) de mevinolina 10  $\mu$ M se inmunoprecipitaron con suero de paciente 9190, tal como se describe en esta memoria más adelante. En la Figura 5B, se inmunoprecipitó proteína HMG-CoA reductasa de transcripción/traducida *in vitro* (IVTT) de longitud completa marcada con  $^{35}$ S-metionina utilizando sueros de pacientes anti-200/100-kd-positivos (pistas 3-7; representativas de 16 muestras de suero anti-200/100-kd-positivo sometidas a ensayo), pacientes anti-200/100 kd-negativos con dermatomiositis (pistas 8-10), o controles sanos (pistas 11-13). El producto IVTT de entrada se muestra en la pista 14. Los resultados en A y B son representativos de al menos 3 experimentos separados. A la izquierda se muestran marcadores del peso molecular.

10 La Figura 6 es una auto-radiografía que muestra los resultados de una inmunoprecipitación (IP) de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMGCR) de longitud completa y un trozo correspondiente al extremo C (aminoácidos 340-888) por parte de anticuerpos anti-HMGCR humanos. Las inmunoprecipitaciones se realizaron utilizando 3 productos de HMGCR diferentes marcados con  $^{35}$ S-metionina: de longitud completa (FL; pistas 4-8), extremo C (extr. C; pistas 9-13), y extremo N (extr. N; pistas 14-18). Las muestras de suero 10009, 9190 y 8050 son de pacientes anti 200/100-kd-positivos; las muestras 488 y 495 son de sujetos normales de control. Los productos de transcripción/traducidos *in vitro* (IVTT) de entrada se muestran en las pistas 1-3; en cada caso, se utilizó 0,4 veces la cantidad utilizada para la inmunoprecipitación. Los resultados son representativos de 2-8 experimentos separados. A la izquierda se muestran marcadores del peso molecular.

20 Las Figuras 7A y 7B incluyen tres auto-radiografías. La Figura 3A muestra los resultados de experimentos de la inmunoprecipitación de competencia (IP), confirmando que los anticuerpos anti-3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa humana (anti-HMGCR) detectan el extremo C y que la proteína de 200 kd no es reconocida por un auto-anticuerpo único. Muestras de suero 10009 y 9190 se pre-incubaron con las cantidades indicadas de HMGCR C-terminal no marcado y luego se utilizaron para inmunoprecipitar HMGCR marcada con  $^{35}$ S-metionina de longitud completa. En la Figura 3B, las muestras de suero de los pacientes 9190 y 9176 se pre-incubaron en ausencia o presencia de 300 ng de HMGCR C-terminal no marcada y se añadieron subsiguientemente a lisados radiomarcados generados a partir de células HeLa tratados con mevinolina 10  $\mu$ M durante veinticuatro horas. Los inmunoprecipitados resultantes se procesaron según se describe en esta memoria más adelante. Datos idénticos se obtuvieron en dos experimentos separados utilizando cuatro (7A) o seis (7B) sueros de pacientes diferentes. A la izquierda se muestran marcadores del peso molecular.

30 Las Figuras 8A-8F incluyen fotomicrografías que muestran una sobre-regulación de la expresión de HMG-CoA reductasa en la regeneración de miofibras que expresan la molécula de adhesión celular neural (NCAM). Muestras de biopsia muscular de pacientes anti-HMGCR-positivos (Figuras 8A-8C) y sujetos control (Figuras 8D-8F) fueron co-teñidas con anticuerpos anti-NCAM (verde) (Figuras 8A y 8D), anticuerpos anti-HMGCR (rojo) (Figuras 8B y 8E) y DAPI (azul) para teñir los núcleos. Imágenes de superposición (Figuras C y F) demuestran que HMGCR y NCAM se co-expresan con frecuencia a altos niveles en las mismas miofibras en los tejidos de biopsia muscular anti-HMGCR-positivos (flechas), pero no en los tejidos de biopsia muscular de control. Para asegurar la comparabilidad, las Figuras 8A-8C y 8D-8F se obtuvieron utilizando los ajustes de exposición idénticos para cada uno de los canales. Los resultados son representativos de la tinción vista en seis muestras de biopsia anti-HMGCR-positivas y tres muestras de biopsia muscular normales. Aumento original X 20.

#### 40 Definiciones

45 Por "proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR)" se quiere dar a entender un polipéptido o fragmento del mismo que tiene al menos aproximadamente 85% de aminoácidos de identidad de la secuencia con NCBI Ref: NP\_000850.1 o un fragmento del mismo que tiene actividad de unión del anticuerpo de HMGCR. Un fragmento preferido es un fragmento C-terminal que incluye la porción intracelular de la molécula (aa 340-888), que se muestra en negritas/subrayado más adelante.

Se proporciona a continuación una secuencia de la proteína HMGCR a modo de ejemplo:

> gi 145576431 Irefl NP\_000850.1 I3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa isoforma 1 [Homo sapiens]

MLSRFRMHGLFVASHPWEVIVGTVTLTICMMSMNMF TGNKICGWNYECPKFEEDVLSSDIIILITITRC  
 IAILYIYFQFQNLRLQLGSKYILGIAGLFTIFSSVFVSTVVIHFLDKELTGLNEALPFFLLIDLSRSTL  
 AKFALSSNSQDEVRENIARGMAILGPTFTLDALVECLVIGVGTMSGVRQLEIMCCFGCMSVLANYFVFM  
 FFPACVSLVLELSRESREGRPIWQLSHFARVLEEEENKPNPVTQRVKMIMSLGLVLVHAHSRWIADPSPQ  
 NSTADTSKVSGLDENVSKRIEPSVSLWQFYLSKMSMDIEQVITLSLALLLAVKYIFFEQTETESTLSL  
KNPITSPVVTQKKVPDNCRRPMLVRNNQKDCSVEEETGINRERKVEVIKPLVAETDTPNRATFVVGNS  
SLDTSVSVLVTQEPETELPREPRNEECLQILGNAEKGAKFLSDAEIIQLVNAKHIPAYKLETLMETHER  
GVSIRRQLLSKKLSEPSLQYLPYRDYNSLVMGACCENVI GYMP IPVGVAGPLCLDEKEFQVPMATTEG  
CLVASTNRGCRAIGLGGGASSRVLADGMTRGPVRLPRACDSAEVKAWLETSEGFVAVIKEAFDSTSRFAR  
LQKLHTSIAGRNLIRFQSRSGDAMGMNMI SKGTEKALS KLHEYFP EMQILAVSGNYCTDKKPAAINWIE  
GRGKSVVCEAVIPAKVVREVLKTTTEAMIEVNINKNLVGSAMAGSIGGYNAHAANIVTAIYIACGQDAAQ  
NVGSSNCITLMEASGPTNEDLYISCTMPSIEIGTVGGGTNLLPQQACLQMLGVQACKDNPGENARQLAR  
IVCGTVMAGELSLMAALAAGHLVKSHMIHNRSKINLQDLQGACTKKTA

Por "auto-anticuerpo" se quiere dar a entender un anticuerpo que está dirigido contra un auto-antígeno. Un auto-anticuerpo a modo de ejemplo es uno que está dirigido contra HMGR.

5 Por "anticuerpo de HMGR" se quiere dar a entender un anticuerpo que se une específicamente a la proteína HMGR.

10 Por "miopatía" se quiere dar a entender un estado muscular asociado con debilidad o dolor muscular. Otros marcadores de miopatía incluyen, pero no se limitan a la presencia de auto-anticuerpos anti-sintetasa, auto-anticuerpos anti-partícula de reconocimiento de señal (SRP), auto-anticuerpos con niveles elevados de creatina quinasa (CK), infiltrados marcados de células inflamatorias en la biopsia muscular, vacuolas ribeteadas, atrofia perifascicular, MHC positivo de clase I, deposición del complejo de ataque a la membrana en pequeños vasos sanguíneos perimisiales y tinción de anticuerpos anti-NCAM de fibras musculares regenerantes. Otros marcadores incluyen debilidad muscular proximal, evidencia de miopatía en la electromiografía (EMG), infiltrados marcados de células inflamatorias en la biopsia muscular, vacuolas ribeteadas, atrofia perifascicular y edema muscular en la MRI bilateral del muslo.

15 Por "inmunoensayos" se quiere dar a entender un ensayo que mide la presencia o el nivel de una sustancia basada en la unión de anticuerpos específicos.

Por "inmunosupresión" se quiere dar a entender la reducción de al menos una función indeseable del sistema inmune.

20 Por "inmunosupresor" se quiere dar a entender un agente que reduce la función del sistema inmunológico. Ejemplos de inmunosupresores incluyen glucocorticoides (p. ej., prednisona), citostáticos (p. ej., azatioprina y metotrexato), fármacos que actúan sobre inmunofilinas (p. ej., ciclosporina y tacrolimus) y otros fármacos (p. ej., hidroxicloroquina, inmunoglobulina intravenosa, micofenolato mofetil y rituximab).

25 Por "sustrato" se quiere dar a entender cualquier soporte sólido. Soportes sólidos a modo de ejemplo incluyen una placa de microtitulación, un portaobjetos de microscopio, una perla de poliestireno, un tubo de ensayo, un dispositivo de flujo lateral, una tira de ensayo o una varilla de medición.

Por "estatina" se quiere dar a entender una clase de fármaco que se utiliza para reducir los niveles de colesterol al inhibir la enzima HMG-CoA reductasa. Ejemplos de estatinas incluyen atorvastatina (Lipitor® y Torvast), fluvastatina (Lescol), lovastatina (Mevacor®, Altacor, Mevinolin y Altoprev®), pitavastatina (Livalo®, Pitava), pravastatina (Pravachol, Selektine y Lipostat), rosuvastatina (Crestor®) y simvastatina (Zocor® y Lipex™).

30 Por "agente" se quiere dar a entender cualquier compuesto químico de moléculas pequeñas, anticuerpo, molécula de ácido nucleico o polipéptido, o fragmentos de los mismos.

5 Por "alteración" se quiere dar a entender un cambio (aumento o disminución) de los niveles de expresión o actividad de un gen o polipéptido tal como es detectado por n métodos estándares conocidos tales como los descritos en esta memoria. Tal como se utiliza en esta memoria, una alteración incluye un cambio del 10% en los niveles de expresión, preferiblemente un cambio del 25%, más preferiblemente un cambio del 40%, y lo más preferiblemente un cambio del 50% o mayor en los niveles de expresión.

Por "mejorar" se quiere dar a entender disminuir, suprimir, atenuar, disminuir, detener o estabilizar el desarrollo o progreso de una enfermedad.

10 Por "análogo" se quiere dar a entender una molécula que no es idéntico, pero que tiene rasgos funcionales o estructurales análogos. Por ejemplo, un análogo de polipéptido conserva la actividad biológica de un polipéptido que se produce de forma natural correspondiente, al tiempo que tiene determinadas modificaciones bioquímicas que potencian la función del análogo con respecto a un polipéptido que se produce de forma natural. Modificaciones bioquímicas de este tipo podrían aumentar la resistencia a proteasa del análogo, la permeabilidad de la membrana o la semivida, sin alterar, por ejemplo, la unión al ligando. Un análogo puede incluir un aminoácido no natural.

15 Por "muestra biológica" se quiere dar a entender cualquier tejido, célula, fluido u otro material derivado de un organismo.

20 En esta descripción, "comprende", "que comprende", "que contiene" y "que tiene" y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la Ley de Patentes de EE.UU. y puede significar "incluye", "que incluye", y similares; de igual manera, "consiste esencialmente en" o "consiste esencialmente" tiene el significado atribuido en la Ley de Patentes de EE.UU. y el término/expresiones son abiertos, permitiendo la presencia de más de lo que se recita siempre que las características básicas o nuevas de lo que se recita no cambien por la presencia de más de lo que se recita, pero excluye realizaciones de la técnica anterior.

25 Por "control" se quiere dar a entender un patrón de comparación. Por ejemplo, el nivel de un auto-anticuerpo en una muestra de un sujeto sospechoso de tener una miopatía necrotizante inmunomediada se puede comparar con el nivel del autoanticuerpo presente en una muestra correspondiente de un sujeto normal, es decir, uno que no tiene una miopatía.

"Detectar" se refiere a identificar la presencia, ausencia o cantidad del analito a detectar.

30 Por "marcador detectable" se quiere dar a entender una composición que cuando se enlaza a una molécula de interés hace a esta última detectable a través de medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, marcadores útiles incluyen isótopos radiactivos, perlas magnéticas, perlas metálicas, partículas coloidales, colorantes fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas (por ejemplo, como se utilizan comúnmente en un ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos.

35 Por "diagnosticar" se quiere dar a entender cualquier método que identifica la presencia de un estado patológico o caracteriza la naturaleza de un estado patológico (p. ej., una miopatía). Los métodos de diagnóstico difieren en su sensibilidad y especificidad. Mientras que un método de diagnóstico particular puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de un estado, es suficiente que el método proporcione una indicación positiva que ayude en el diagnóstico.

Por "enfermedad" se entiende cualquier afección o trastorno que dañe o interfiera con la función normal de una célula, tejido u órgano. Ejemplos de enfermedades incluyen enfermedades autoinmunes, miopatía y miopatía autoinmune asociada a estatinas.

40 Por "cantidad eficaz" se quiere dar a entender la cantidad requerida para mejorar los síntomas de una enfermedad con respecto a un paciente no tratado. La cantidad eficaz de compuesto o compuestos activos para el tratamiento terapéutico de una enfermedad varía dependiendo de la forma de administración, la edad, el peso corporal y la salud general del sujeto. En última instancia, el médico o veterinario que atienda decidirá la cantidad y el régimen de dosificación apropiado. A dicha cantidad se la alude como una cantidad "eficaz".

45 Por "fragmento" se quiere dar a entender una parte de un polipéptido o molécula de ácido nucleico. Esta parte contiene, preferiblemente, al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la longitud completa de la molécula de ácido nucleico o polipéptido de referencia. Un fragmento puede contener 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ó 1000 nucleótidos o aminoácidos.

- 5 Por un "polipéptido aislado" se quiere dar a entender un polipéptido que ha sido separado de componentes que lo acompañan de forma natural. Típicamente, el polipéptido es aislado cuando está al menos 60% en peso libre de las proteínas y moléculas orgánicas que se producen de forma natural con las que se asocia de forma natural. Preferiblemente, la preparación es al menos 75%, más preferiblemente al menos 90%, y más preferiblemente al menos 99%, en peso, un polipéptido de la descripción. Un polipéptido aislado puede obtenerse, por ejemplo, mediante extracción de una fuente natural, mediante expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de ese tipo; o sintetizando químicamente la proteína. La pureza puede medirse por cualquier método apropiado, por ejemplo cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida, o mediante análisis HPLC.
- 10 Por "marcador" se quiere dar a entender cualquier alteración en una proteína, polinucleótido o indicador clínico que se asocia con una enfermedad o trastorno.
- Tal como se utiliza en esta memoria, "obtener" como en "obtener un agente" incluye sintetizar, comprar o adquirir de otro modo el agente.
- Por "periódico" se quiere dar a entender a intervalos regulares. La vigilancia periódica del paciente incluye, por ejemplo, un plan de ensayos que se produzca semanal, mensual, semestral o anualmente.
- 15 Por "reduce" o "aumenta" se quiere dar a entender una alteración negativa o positiva, respectivamente, de al menos aproximadamente 10%, 25%, 50%, 75% o 100% con respecto a una referencia.
- Por "referencia" se quiere dar a entender un estado estándar o control.
- Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida utilizada como base para la comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto o la totalidad de una secuencia especificada; por ejemplo, un segmento de un ADNc de longitud completa o secuencia génica, o el ADNc completo o la secuencia génica completa. Para los polipéptidos, la longitud de la secuencia de polipéptido de referencia será generalmente de al menos aproximadamente 16 aminoácidos, preferiblemente al menos aproximadamente 20 aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente 25 aminoácidos, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 35 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos o aproximadamente 100 aminoácidos. Para los ácidos nucleicos, la longitud de la secuencia de ácido nucleico de referencia será generalmente de al menos aproximadamente 50 nucleótidos, preferiblemente al menos aproximadamente 60 nucleótidos, más preferiblemente al menos aproximadamente 75 nucleótidos, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 100 nucleótidos o aproximadamente 300 nucleótidos o cualquier número entero alrededor de las mismas o entre las mismas.
- 20
- 25
- 30 Por "se une específicamente" se quiere dar a entender un compuesto o anticuerpo que reconoce y se une a un polipéptido utilizado en la invención, pero que no reconoce sustancialmente ni se une a otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica, que incluye de forma natural un polipéptido utilizado en la invención.
- La identidad de secuencia se mide típicamente utilizando un software de análisis de la secuencia (por ejemplo, el Sequence Analysis Software Package de Genetics Computer Group, Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, programas BLAST, BESTFIT, GAP o PILEUP/PRETTYBOX). Este tipo de software empareja secuencias idénticas o similares asignando grados de homología a diversas sustituciones, deleciones y/u otras modificaciones. Sustituciones conservadoras incluyen típicamente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. En un enfoque a modo de ejemplo para determinar el grado de identidad, se puede utilizar un programa BLAST, con una puntuación de probabilidad entre  $e^{-3}$  y  $e^{-100}$  que indica una secuencia estrechamente relacionada.
- 35
- 40 Por "sujeto" se quiere dar a entender un mamífero, incluyendo, pero no limitado a un mamífero humano o no humano, tal como un animal bovino, equino, canino, ovino o felino.
- Por "sustancialmente idéntico" se quiere dar a entender un polipéptido o molécula de ácido nucleico que exhibe una identidad de al menos 50% a una secuencia de aminoácidos de referencia (por ejemplo, una cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en esta memoria) o secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una cualquiera de las secuencias de ácido nucleico descritas en esta memoria). Preferiblemente, dicha secuencia es al menos 60%, más preferiblemente 80% u 85%, y más preferiblemente 90%, 95% o incluso 99% idéntica al nivel de aminoácidos o ácidos nucleicos a la secuencia utilizada para la comparación.
- 45

5 La descripción proporciona un cierto número de objetivos que son útiles para el desarrollo de fármacos altamente específicos para tratar un trastorno caracterizado por los métodos delineados en esta memoria. Además, los métodos descritos proporcionan medios fáciles para identificar las terapias que son seguras para su uso en sujetos. Además, los métodos de la invención proporcionan una vía para analizar virtualmente cualquier número de compuestos para los efectos sobre una enfermedad descrita en esta memoria con un rendimiento de alto volumen, alta sensibilidad y baja complejidad.

10 Se entiende que los intervalos proporcionados en esta memoria son una abreviatura para todos los valores dentro del intervalo. Por ejemplo, se entiende que un intervalo de 1 a 50 incluye cualquier número, combinación de números, o sub-intervalo del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50.

Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "tratar", "tratando", "tratamiento" y similares se refieren a reducir o aliviar un trastorno y/o síntomas asociados con el mismo. Se apreciará que, aunque no se excluya, el tratamiento de un trastorno o afección no requiere que el trastorno, afección o síntomas asociados con el mismo se eliminen por completo.

15 A menos que se indique específicamente o resulte obvio a partir del contexto, tal como se utiliza en esta memoria, el término "o" se entiende que es inclusivo. A menos que se especifique o sea obvio a partir del contexto, tal como se utiliza en esta memoria, los términos "un", "una" y "el", "la" se entienden que pueden ser en singular o plural.

20 A menos que se indique específicamente o resulte obvio a partir del contexto, tal como se utiliza en esta memoria, el término "aproximadamente" se entiende que está dentro de un intervalo de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo dentro de 2 desviaciones estándares de la media. Aproximadamente puede entenderse como dentro del 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% o 0,01% del valor establecido. A menos que se desprenda del contexto, todos los valores numéricos proporcionados en esta memoria están modificados por el término aproximadamente.

25 La relación de una lista de grupos químicos en cualquier definición de una variable en esta memoria incluye definiciones de esa variable como cualquier grupo individual o combinación de grupos mencionados. La relación de una realización para una variable o aspecto en esta memoria incluye esa realización como cualquier realización individual o en combinación con cualquier otra realización o partes de la misma.

Cualesquiera composiciones o métodos proporcionados en esta memoria se pueden combinar con una o más de cualquiera de las otras composiciones y métodos proporcionados en esta memoria.

### 30 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención presenta métodos para diagnosticar una miopatía necrotizante inmunomediada en un sujeto.

La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que en determinados pacientes el uso de estatinas se asocia con una miopatía necrotizante autoinmuno-mediada con auto-anticuerpos que reconocen proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR).

35 Tal como se informó en detalle a continuación, se realizó el descubrimiento de nuevos auto-anticuerpos en pacientes con miopatía necrotizante al caracterizar pacientes que tienen necrosis miofibrilar sin inflamación prominente, un hallazgo inespecífico en pacientes con distrofias y miopatías tóxicas o inmunomediadas. Dado que la etiología de una miopatía necrotizante es a menudo oscura, la cuestión de cómo tratar a estos pacientes, es decir, si se beneficiarían de la inmunosupresión, quedó sin respuesta. Para desarrollar un método para el diagnóstico y  
40 tratamiento de estos pacientes con miopatía necrotizante, se analizaron las muestras de biopsia muscular y muestras de suero de 225 pacientes con miopatía. Las especificidades de anticuerpos se determinaron mediante la realización de inmunoprecipitaciones de lisados de células HeLa marcados con <sup>35</sup>S-metionina. Las muestras de biopsia seleccionadas se tiñeron para el complejo de ataque a la membrana, complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y el marcador de células endoteliales CD31. Muestras de biopsia muscular de treinta y ocho de los  
45 225 pacientes mostraron predominantemente necrosis miofibrilar. Doce de estos pacientes tenían una asociación de auto-anticuerpos conocida con u otra etiología para su miopatía. Dieciséis de los restantes veintiséis sueros inmunoprecipitaron proteínas de 200-kD y 100-kD; esta especificidad se observó en sólo uno de los 187 pacientes sin miopatía necrotizante. Los pacientes con el auto-anticuerpo anti-200/100-kD (10.333 UI/litro) y una miopatía irritable en electromiografía (88%). Sesenta y tres por ciento de estos pacientes habían estado expuestos a las  
50 estatinas antes de la aparición de debilidad. Todos los pacientes respondieron a la terapia inmunosupresora, y

muchos experimentaron una recaída de debilidad cuando se disminuyó gradualmente la medicación. Estudios inmunohistoquímicos demostraron un complejo de ataque a la membrana en pequeños vasos sanguíneos en seis de los ocho pacientes y en la superficie de miofibras no necróticas en cuatro de ocho pacientes. Cinco de los ocho pacientes tenían morfología capilar anormal, y cuatro de ocho pacientes expresaban MHC de clase I en la superficie de miofibras no necróticas. A partir de estos datos, es claro que una especificidad de auto-anticuerpos anti-200/100-kD define un subgrupo de pacientes con miopatía necrotizante que previamente se consideró auto-anticuerpos negativa. Tras el descubrimiento inicial de nuevos auto-anticuerpos en pacientes con miopatía necrotizante, se llevaron a cabo experimentos adicionales tal como se informa en detalle más adelante, para identificar los auto-antígenos de 200-kD y 100-kD fijados como objetivo por los auto-anticuerpos en un esfuerzo por ayudar a aclarar el mecanismo de la enfermedad de miopatía necrotizante inmunomediada (IMNM) y facilitar su diagnóstico. Además de inducir una miopatía auto-limitada, el uso de estatinas se asocia con una miopatía necrotizante inmunomediada (IMNM), con auto-anticuerpos que reconocen auto-antígenos de 200-kD y 100-kD. Para identificar estas moléculas, los efectos del tratamiento con estatinas sobre la expresión de auto-antígeno fueron abordados por inmunoprecipitación utilizando sueros de pacientes. La identidad del auto-antígeno ~ 100-kD fue confirmada por inmunoprecipitación de proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG CoA reductasa o HMGCR) transcrita/traducida *in vitro* (IVIT). La expresión de HMG CoA reductasa en el músculo se analizó mediante inmunofluorescencia. Una cohorte de pacientes con miopatía se rastreó en cuanto a auto-anticuerpos anti-HMG CoA reductasa mediante un análisis con enzima unida a inmunosorbente (ELISA) y se genotipó para el alelo rs4149056 C, un predictor de miopatía por estatinas autolimitada. La exposición de estatinas indujo la expresión de los auto-antígenos de ~ 200-kD/~ 100-kD en células cultivadas. HMG CoA reductasa fue identificada como el auto-antígeno de 100-kD. Los experimentos de competición demostraron que no hay auto-anticuerpos distintos que reconocen la proteína de ~ 200 kD. En tejidos de biopsias musculares de pacientes auto-anticuerpos anti-HMG CoA reductasa positivos, la expresión de HMG-CoA reductasa fue sobre-regulada en células que expresan la molécula de adhesión de células neurales (NCAM), un marcador de la regeneración muscular. Auto-anticuerpos anti-HMG CoA reductasa se encontraron en cuarenta y cinco de 750 pacientes que acuden al Johns Hopkins Myositis Center (6%). Entre pacientes de entre cincuenta años o más, 92,3% había tomado estatinas. La prevalencia del alelo rs4149056 C no era mayor en pacientes con positividad de auto-anticuerpos anti-HMG-CoA reductasa. Las estatinas sobre-regulan la expresión de HMGCR, la diana principal de auto-anticuerpos en IMNM asociada a estatinas. La regeneración de células musculares expresan altos niveles de HMGCR, que pueden sostener la respuesta inmune, incluso después de haber suspendido las estatinas. Estos estudios demuestran una relación mecanicista entre un desencadenante medioambiental y el desarrollo de autoinmunidad sostenida.

Estos hallazgos indican que el uso de estatinas desencadena una respuesta autoinmune contra HMG CoA reductasa al sobre-regular la expresión de este auto-antígeno. Incluso después de suspender el uso de estatinas, la presencia de altos niveles de HMG-CoA reductasa en la regeneración de las fibras musculares perpetúa la respuesta inmune, los sujetos que toman estatinas deben ser vigilados en cuanto a la presencia de auto-anticuerpos. Si se detectan anticuerpos en un sujeto que toma una estatina él/ella debería dejar de tomar la estatina y debería ser tratado con una terapia inmunosupresora para prevenir o reducir la gravedad de los síntomas miopáticos inmunomediados. Como se desprende de los Ejemplos que figuran más adelante y en otras partes en esta Solicitud, la detección de auto-anticuerpos anti-HMG CoA reductasa facilita el diagnóstico y la terapia directa de una miopatía necrotizante inmunomediada.

#### Estatinas

Las estatinas reducen los niveles de colesterol mediante la inhibición específica de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG CoA reductasa o HMGCR), una enzima clave en la vía de la biosíntesis de colesterol. Estos fármacos reducen significativamente los puntos finales cardiovasculares y se encuentran entre los medicamentos más comúnmente prescritos, con casi 30 millones de personas en los EE.UU. a las que se prescribieron estatinas en 2005 (Stagnitti MN. Rockdale (MD): Agency for Healthcare Research and Quality; mayo de 2008. Statistical brief 205). Ejemplos de estatinas incluyen atorvastatina (Lipitor® y Torvast), fluvastatina (Lescol), lovastatina (Mevacor®, Altacor, Mevinolin y Altoprev®), pitavastatina (Livalo®, Pitava), pravastatina (Pravachol, Selektine y Lipostat), rosuvastatina (Crestor®) y simvastatina (Zocor® y Lipex™).

Los síntomas músculo-esqueléticos son una complicación bien conocida del uso de estatinas y oscilan desde mialgias y calambres, que se producen en 9-20% de los usuarios de estatinas (De Sauvage Nolting *et al.*, *Am J Cardiol* 2002; 90:181-4; Bruckert *et al.*, *Cardiovasc Drugs Ther* 2005; 19:403-14; y Franc *et al.*, *Cardiovasc Drugs Ther* 2003; 17:459-65), a rhabdomiólisis que pone la vida en peligro, un evento raro que se produce a una tasa del - 0,4 por cada 10.000 pacientes al año (Graham *et al.*, *JAMA* 2004; 292:2585-90).

En la mayoría de casos, eventos miopáticos inducidos por estatinas son auto-limitados, con una recuperación completa en las semanas o meses después de suspender la estatina (Soininen *et al.*, *Basic Clin Pharmacol Toxicol*

2006;98:51-4). Sin embargo, dos estudios recientes han descrito treinta y tres pacientes que desarrollaron una miopatía autoinmune después de la exposición con estatinas, que no disminuyó después de suspender las estatinas (Needham *et al.*, *Neuromuscul Disord* 2007; 17:194-200 y Grable-Esposito *et al.*, *Muscle Nerve* 2010; 41:185-90).

#### Diagnóstico

5 La presente descripción presenta ensayos de diagnóstico para la detección de auto-anticuerpos que reconocen la proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR) en una muestra biológica de un sujeto. En una  
 10 realización, los niveles de tales auto-anticuerpos se miden en una muestra de un sujeto y se utilizan para caracterizar una enfermedad autoinmune, miopatía asociada con una respuesta autoinmune asociada con la terapia con estatinas y miopatía necrotizante, o una propensión a desarrollar tal afección. Se pueden utilizar métodos  
 15 estándares para medir los niveles de un auto-anticuerpo en una muestra biológica. Muestras biológicas incluyen muestras de tejido (p. ej., muestras de células, muestras de biopsia) y fluidos corporales, que incluyen, pero no se limitan a sangre, suero sanguíneo y plasma. Métodos para medir los niveles de polipéptidos incluyen inmunoensayo, ELISA, transferencia western y radioinmunoensayo o cualquier otro método conocido en la técnica. Niveles elevados de auto-anticuerpos solos o en combinación con uno o más marcadores adicionales se consideran un indicador  
 20 positivo de la enfermedad autoinmune. El aumento de auto-anticuerpos puede ser al menos aproximadamente 10%, 25%, 50%, 75% o más. En una realización, cualquier aumento en un marcador descrito es indicativo de enfermedad autoinmune, miopatía o miopatía necrotizante.

Se puede utilizar cualquier método adecuado para detectar auto-anticuerpos y otros marcadores descritos en esta memoria que son útiles en la definición de la etiología de una miopatía. En particular, auto-anticuerpos que  
 25 reconocen la proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR) se pueden utilizar solos o en combinación con auto-anticuerpos anti-sintetasa (anti-Jo-1, anti-PL-12, anti-PL-7), auto-anticuerpos anti-partícula de reconocimiento de señal (SRP). También se pueden evaluar otros indicadores clínicos de miopatía, que incluyen pero no se limitan a debilidad muscular proximal, niveles elevados de creatina quinasa (CK), evidencia de miopatía en electromiografía (EMG), infiltrados marcados de células inflamatorias en la biopsia muscular, atrofia perifascicular, edema muscular en la MRI bilateral del muslo, MHC positivo de clase I, deposición del complejo de  
 30 ataque a la membrana en pequeños vasos sanguíneos perimisiales y tinción de anticuerpos anti-NCAM para identificar tejidos musculares regenerantes.

El éxito de la práctica de la invención se puede lograr con uno o una combinación de métodos que pueden detectar y, preferiblemente, cuantificar este tipo de marcadores. Estos métodos incluyen, sin limitación, métodos basados en  
 35 la hibridación, incluyendo los empleados en matrices de biochip, espectrometría de masas (p. ej., espectrometría de masas láser de desorción/ionización), fluorescencia (p. ej., inmunoensayo de tipo sándwich), resonancia de plasmón de superficie, elipsometría y microscopía de fuerza atómica. Los niveles de expresión de marcadores (p. ej., polinucleótidos o polipéptidos) se comparan por procedimientos bien conocidos en la técnica tales como RT-PCR, transferencia Northern, transferencia Western, citometría de flujo, inmunocitoquímica, la unión a perlas magnéticas y/o revestidas de anticuerpos, hibridación *in situ*, hibridación *in situ* fluorescente (FISH), ensayo de adhesión de la cámara de flujo, ELISA, análisis de micromatrices o ensayos colorimétricos. Los métodos pueden incluir, además, uno o más de espectrometría de masas de ionización por electronebulización (ESI-MS), ESI-MS/MS, ESI-MS/(MS)<sup>n</sup>,  
 40 espectrometría de masas en tiempo de vuelo mediante ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS), espectrometría de masas en tiempo de vuelo mediante desorción/ionización por láser de superficie (SELDI-TOF-MS), desorción/ionización sobre silicio (DIOS), espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS), cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF), espectrometría de masas de ionización química a presión atmosférica (APCI-MS), APCI-MS/MS APCI-(MS)<sup>n</sup>, espectrometría de masas de fotoionización a presión atmosférica (APPI-MS), APPI-MS/MS y APPI-(MS)<sub>n</sub>, espectrometría de masas cuadrupolo, espectrometría de masas de transformada de fourier (FTMS) y espectrometría de masas con trampa iónica, en que n es un número entero mayor que cero.

45 Los métodos de detección pueden incluir el uso de una matriz de biochip. Matrices de biochip útiles en la invención incluyen matrices de proteínas y polinucleótidos. Uno o más marcadores se capturan en la matriz de biochip y se someten a análisis para detectar el nivel de los marcadores en una muestra.

Los auto-anticuerpos pueden ser capturados con reactivos de captura tales como proteínas 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR) o fragmentos de las mismas inmovilizados a un soporte sólido tal como un biochip,  
 50 una placa de microtitulación de múltiples pocillos, una resina o una membrana de nitrocelulosa que se sondeó posteriormente en cuanto a la presencia o nivel de un marcador. En una realización, el fragmento es un fragmento C-terminal que incluye la porción intracelular de la molécula (aa 340-888). La captura puede ser sobre una superficie cromatográfica o una superficie bioespecífica. Por ejemplo, se puede utilizar una muestra que contiene los auto-anticuerpos, tales como suero, para ponerse en contacto con la superficie activa de un biochip durante un tiempo  
 55 suficiente para permitir la unión. Moléculas no unidas se lavan de la superficie utilizando un eluyente adecuado tal

como solución salina tamponada con fosfato. En general, cuanto más estricto sea el eluyente, más fuertemente deben estar unidas las proteínas para quedar retenidas después del lavado.

Tras la captura en un biochip, los auto-anticuerpos pueden ser detectados mediante una diversidad de métodos de detección seleccionados, por ejemplo, de un método de espectrometría de iones en fase gaseosa, un método óptico, un método electroquímico, microscopía de fuerza atómica y un método de radiofrecuencia. En una realización, se utiliza la espectrometría de masas y, en particular, SELDI. Métodos ópticos incluyen, por ejemplo, la detección de fluorescencia, luminiscencia, quimioluminiscencia, absorbancia, reflectancia, transmitancia, birrefringencia o índice de refracción (p. ej., la resonancia de plasmón de superficie, elipsometría, un método de espejo resonante, un método de guíasondas acoplador en una rejilla o interferometría). Métodos ópticos incluyen microscopía (tanto confocal como no confocal), métodos de formación de imágenes y métodos de no formación de imágenes. Los inmunoensayos en diversos formatos (p. ej., ELISA) son métodos populares para la detección de analitos capturados en una fase sólida. Métodos electroquímicos incluyen métodos de voltametría y amperometría. Métodos de radiofrecuencia incluyen espectroscopia de resonancia multipolar.

En una realización, el nivel de auto-anticuerpos se mide en al menos dos ocasiones diferentes y una alteración en los niveles en comparación con los niveles normales de referencia con el tiempo se utiliza como un indicador de la presencia o progresión de la enfermedad autoinmune, miopatía, miopatía necrotizante. El nivel de marcador en los fluidos corporales (p. ej., sangre, suero sanguíneo, plasma) de un sujeto que padece enfermedad autoinmune, miopatía o miopatía necrotizante puede ser alterado en tan poco como 10%, 20%, 30% o 40%, o en tanto hasta 50%, 60%, 70%, 80% o 90% o más, con respecto al nivel de este marcador en un control normal. En general, los niveles de auto-anticuerpos que reconocen la proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR) están presentes en niveles bajos o indetectables en un sujeto sano (es decir, los que no tienen y/o que no desarrollan miopatía). En una realización, una muestra objeto de un fluido corporal (p. ej., sangre, suero sanguíneo, plasma) se recoge antes de la aparición de los síntomas de miopatía, pero después del inicio de la terapia con estatinas.

Los métodos de diagnóstico descritos en esta memoria se pueden utilizar individualmente o en combinación con cualquier otro método de diagnóstico descrito en esta memoria para un diagnóstico más preciso de la presencia o la gravedad de la miopatía.

Los métodos de diagnóstico descritos en esta memoria también se pueden utilizar para vigilar y gestionar una miopatía, o para distinguir de forma fiable una miopatía necrotizante de otras miopatías.

Como se ha indicado anteriormente, se describen métodos para ayudar a un diagnóstico de miopatía humana utilizando uno o más marcadores, según se especifica en esta memoria. Un auto-anticuerpo que reconoce la proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR) se puede utilizar solo, en combinación con otros auto-anticuerpos asociados con miopatía autoinmune, o con otros indicadores clínicos, útiles en el diagnóstico de ayuda de miopatía humana. Los auto-anticuerpos están diferencialmente presentes en muestras de un paciente humano con miopatía necrotizante y un sujeto normal en quien no es detectable una miopatía. Por lo tanto, la detección de auto-anticuerpos en una persona proporcionaría información útil con respecto a la probabilidad de que la persona pueda tener miopatía necrotizante o en cuanto a su propensión a desarrollar la enfermedad.

La detección de auto-anticuerpos que reconocen la proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR) se correlaciona con enfermedad autoinmune, miopatía asociada con una respuesta autoinmune asociada con la terapia con estatinas y miopatía necrotizante. En algunas realizaciones, la detección de la mera presencia de auto-anticuerpos que reconocen la proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR), sin cuantificar la cantidad de la misma, es útil y se puede correlacionar con un diagnóstico probable de miopatía. La medición de auto-anticuerpos también puede implicar la cuantificación de los auto-anticuerpos para correlacionar la detección de marcadores con un diagnóstico probable de la enfermedad autoinmune, miopatía asociada con una respuesta autoinmune asociada con la terapia con estatinas y miopatía necrotizante. Por lo tanto, si la cantidad de los marcadores detectados en un sujeto que está siendo sometido a ensayo es diferente en comparación con una cantidad control (es decir, más alta que el control), entonces el sujeto que está siendo sometido a ensayo tiene una mayor probabilidad de tener la enfermedad autoinmune, miopatía asociada con una respuesta autoinmune asociada con la terapia con estatinas, y miopatía necrotizante.

La correlación puede tener en cuenta la cantidad de los auto-anticuerpos en la muestra en comparación con una cantidad control del marcador o marcadores (p. ej., en sujetos normales en los que la miopatía es indetectable). Un control puede ser, p. ej., la cantidad media o mediana de auto-anticuerpos presentes en muestras equiparables de sujetos normales. La cantidad control se mide en las mismas condiciones o condiciones sustancialmente similares

experimentales que se miden en la cantidad de ensayo. Como resultado, el control puede emplearse como un patrón de referencia, en donde se conoce el fenotipo (no miopatía) normal, y cada uno de los resultados puede ser comparado con el patrón, en lugar de volver a ejecutar un control.

5 En determinadas realizaciones de los métodos de diagnosticar una enfermedad autoinmune, miopatía asociada con una respuesta autoinmune asociada con la terapia con estatinas y miopatía necrotizante, los métodos comprenden, además, la gestión del tratamiento del sujeto basado en el estado. La descripción también proporciona métodos de este tipo, en que los marcadores (o combinación específica de marcadores) se miden de nuevo después de la gestión del sujeto. En estos casos, los métodos se utilizan para supervisar el estado de la miopatía, p. ej., la respuesta al tratamiento de la miopatía, la remisión de la enfermedad o el progreso de la enfermedad.

10 Los diagnósticos descritos, que incluyen inmunoensayos utilizados para detectar la presencia de o medir el nivel de auto-anticuerpos en una muestra biológica de un sujeto, tienen un cierto número de otros usos. Por ejemplo, se pueden utilizar para vigilar las respuestas a determinados tratamientos de la enfermedad autoinmune, miopatía asociada con una respuesta autoinmune asociada con la terapia con estatinas y miopatía necrotizante. Todavía en otro ejemplo, los marcadores se pueden utilizar en estudios de herencia. Por ejemplo, determinados marcadores se  
15 pueden vincular genéticamente. Los marcadores que están vinculados genéticamente se pueden utilizar como una herramienta para determinar si un sujeto está genéticamente predispuesto a padecer una miopatía autoinmune asociada. Por ejemplo, la presencia de un polimorfismo específico en el gen SLCO1B1 (es decir, el alelo rs4149056 C) está fuertemente asociado con el desarrollo de miopatía con estatinas.

20 Cualquier marcador, de forma individual, es útil para ayudar en la determinación de la enfermedad autoinmune, miopatía asociada con una respuesta autoinmune asociada con la terapia con estatinas y miopatía necrotizante. En primer lugar, los auto-anticuerpos que reconocen la proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMGCR) se detectan en una muestra de un sujeto utilizando los métodos descritos en esta memoria. A continuación, el resultado se compara con un control que distingue un estado de miopatía basado en autoinmune a partir de un control. Como es bien sabido en la técnica, las técnicas se pueden ajustar para aumentar la sensibilidad o la especificidad del  
25 ensayo de diagnóstico dependiendo de la preferencia del diagnosticador.

Mientras que marcadores individuales son marcadores de diagnóstico útiles, en algunos casos, una combinación de marcadores proporciona un mayor valor predictivo que los marcadores individuales por sí solos. La detección de una pluralidad de marcadores (o ausencia de los mismos, según el caso) en una muestra puede aumentar el porcentaje de diagnósticos verdaderos positivos y verdaderos negativos y puede disminuir el porcentaje de diagnósticos falsos  
30 positivos o falsos negativos. Por lo tanto, métodos preferidos de la presente invención comprenden la medición de más de un marcador.

#### Ensayos de diagnóstico

Se describe un cierto número de ensayos de diagnóstico que son útiles para la identificación o caracterización de la enfermedad autoinmune, miopatía asociada con una respuesta autoinmune asociada con la terapia con estatinas, y  
35 miopatía necrotizante, o una propensión a desarrollar una afección de este tipo. En una realización, la miopatía se caracteriza por detectar la presencia de auto-anticuerpos que reconocen la proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMGCR), sola o en combinación con uno o más de otros marcadores utilizados para caracterizar la miopatía (p. ej., auto-anticuerpos antisintetasa, auto-anticuerpos de la partícula de reconocimiento anti-señal (SRP), niveles elevados de creatina quinasa (CK), infiltrados marcados de células inflamatorias en la biopsia muscular, atrofia perifascicular, MHC positivo de clase I, deposición del complejo de ataque a la membrana en pequeños vasos  
40 sanguíneos perimisiales y tinción de anticuerpos anti-NCAM de fibras musculares regenerantes). Mientras que los ejemplos proporcionados más adelante describen métodos específicos de detectar niveles de estos marcadores, el experto en la técnica aprecia que la invención no está limitada a métodos de este tipo. Los niveles de auto-anticuerpos son cuantificables mediante cualquier método estándar, incluyendo, pero no limitándose estos métodos a inmunoensayos que detectan la unión de anticuerpos (p. ej., ELISA, transferencia Western, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia). Tales ensayos pueden llevarse a cabo en membranas, tiras de ensayo, biochips o cualquier  
45 otra plataforma conocido en la técnica.

#### Kits de diagnóstico

Se describen kits para diagnosticar o vigilar una enfermedad autoinmune, miopatía asociada con una respuesta autoinmune asociada con la terapia con estatinas y miopatía necrotizante, o para seleccionar un tratamiento para afecciones de este tipo o cualquier otra afección asociada con la presencia de auto-anticuerpos que reconocen la proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMGCR). En una realización, el kit se utiliza para determinar si un  
50

sujeto debe continuar la terapia con estatinas. Para llegar a esta determinación, el médico puede considerar si el sujeto tiene auto-anticuerpos que reconocen la proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMGCR). Tales anticuerpos pueden desarrollarse en semanas, meses o incluso años después de que se inició el tratamiento con estatinas. Si se desea, un sujeto sometido a terapia con estatinas se somete a ensayo de dichos auto-anticuerpos, independientemente de si está o no está mostrando síntomas de miopatía.

En una realización, el kit incluye una composición que contiene al menos un agente que se une a un autoanticuerpo que se une específicamente a la proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMGCR). En determinadas realizaciones, el agente que se une al auto-anticuerpo es un fragmento de la proteína HMGCR, por ejemplo, un fragmento C-terminal. En algunas realizaciones, el kit comprende un recipiente estéril que contiene el agente de unión; tales recipientes pueden ser cajas, ampollas, botellas, viales, tubos, bolsas, bolsitas, envases blíster u otras formas de envase apropiadas conocidas en la técnica. Tales recipientes pueden estar hechos de plástico, vidrio, papel laminado, película de metal, u otros materiales adecuados para contener medicamentos.

Si se desea, el kit se proporciona junto con instrucciones para utilizar el kit para diagnosticar la enfermedad autoinmune, miopatía asociada con una respuesta autoinmune asociada con la terapia con estatinas y/o miopatía necrotizante. Las instrucciones incluirán generalmente información sobre el uso de la composición para el diagnóstico de un sujeto que tiene miopatía o que tiene miopatía necrotizante. En otras realizaciones, las instrucciones incluyen al menos uno de los siguientes: descripción del agente de unión; advertencias; indicaciones; contra- indicaciones; datos del estudio de los animales; datos del estudio clínico; y/o referencias. Las instrucciones se pueden imprimir directamente en el envase (cuando está presente), o como una etiqueta aplicada al recipiente, o como una hoja, folleto, tarjeta o carpeta separada suministrada en o con el recipiente.

#### Tipos de Muestras Biológicas

El nivel de auto-anticuerpos que reconocen una proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMGCR) se mide en diferentes tipos de muestras biológicas. En una realización, el nivel de un auto-anticuerpo se mide en diferentes tipos de muestras biológicas. En otra realización, el nivel de auto-anticuerpos se mide en diferentes tipos de muestras biológicas. En una realización, la muestra biológica es una muestra de tejido que incluye las células musculares (p. ej., células musculares obtenidas en una biopsia muscular). En otra realización, la muestra biológica es una muestra de fluido biológico. Muestras de fluidos biológicos incluyen sangre, suero sanguíneo, plasma, saliva o cualquier otro fluido biológico útil en los métodos de la invención.

#### Selección de un Método de Tratamiento y Vigilancia del Sujeto

Después de haber identificado que un sujeto padece una enfermedad autoinmune, miopatía asociada con una respuesta autoinmune asociada con la terapia con estatinas, y miopatía necrotizante, se selecciona un método de tratamiento. Está disponible un cierto número de regímenes de tratamiento estándares. El nivel o la presencia de auto-anticuerpos que reconocen la proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMGCR) es uno de los factores utilizados en la selección de un método de tratamiento. En una realización, la presencia de auto-anticuerpos que reconocen la proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMGCR) es indicativa de que la terapia inmunosupresora es apropiada. Otros factores relevantes que se pueden utilizar en unión con la presencia de dichos auto-anticuerpos son otros marcadores e indicadores clínicos útiles en la definición de una miopatía (por ejemplo, auto-anticuerpos antisintetasa, auto-anticuerpos de la partícula de reconocimiento anti-señal (SRP), niveles elevados de creatina quinasa (CK), infiltrados marcados de células inflamatorias en la biopsia muscular, vacuolas ribeteadas, atrofia perifascicular, MHC positivo de clase I, deposición del complejo de ataque a la membrana en pequeños vasos sanguíneos perimisiales y tinción de anticuerpos anti-NCAM de fibras musculares regenerantes).

El estado patológico o el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad autoinmune, miopatía asociada con una respuesta autoinmune asociada con una terapia con estatinas y miopatía necrotizante, o una propensión a desarrollar una afección de este tipo puede vigilarse utilizando los métodos y composiciones descritos.

En una realización, se vigila la expresión de marcadores presentes en un fluido corporal tal como sangre, suero sanguíneo y plasma. Esta vigilancia puede ser útil, por ejemplo, para evaluar la eficacia de un fármaco particular (p. ej., un fármaco inmunosupresor) en un sujeto que exhibe síntomas de miopatía. De manera deseable, el tratamiento con el fármaco inmunosupresor reduce los niveles de auto-anticuerpos que reconocen la proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMGCR). Si un tratamiento de este tipo no reduce los niveles de auto-anticuerpos, está indicada una terapia inmunosupresora diferente. Por ejemplo, si los niveles de auto-anticuerpos no se reducen en respuesta a la prednisona, está indicada una terapia de combinación inmunosupresora. Dicha terapia puede implicar a cualquiera de dos o más de los siguientes prednisona, rituximab, inmunoglobulina intravenosa, azatioprina y/o

metotrexato, u otros agentes inmunomoduladores. Los agentes terapéuticos que disminuyen la expresión de un marcador utilizado en la invención (p. ej., auto-anticuerpos que reconocen la proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMGCR)) se consideran particularmente útiles.

#### Kits

5 Se describen kits para el diagnóstico de una enfermedad autoinmune, miopatía asociada con una respuesta autoinmune asociada con la terapia con estatinas y miopatía necrotizante, en particular una respuesta autoinmune asociada con la presencia de auto-anticuerpos que reconocen la proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMGCR). En una realización, el kit incluye un agente que une auto-anticuerpos que se unen específicamente a la proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMGCR). En una realización, este agente se fija a un sustrato.

10 El sustrato es un soporte sólido que puede estar en forma de una tira de papel, varilla de medición, membrana (p. ej., una membrana de nilón o un filtro de celulosa), una placa (p. ej., una placa de microtitulación, una placa de 96 pocillos) o partículas sólidas (p. ej., látex o perlas magnéticas). El soporte sólido puede estar hecho de cualquier material adecuado, que incluye, pero no se limita a un plástico (p. ej., polietileno, polipropileno, poliestireno, látex, poli(cloruro de vinilo), poliuretano, poli(acrilamida), poli(alcohol vinílico), nilón, poli(acetato de vinilo) o cualquier copolímero adecuado de los mismos), celulosa (p. ej., diversos tipos de papel tal como papel de nitrocelulosa, y similares), un polímero de silicio (p. ej., siloxano), un polisacárido (p. ej., agarosa o dextrano), o una resina de intercambio de iones (p. ej., resinas de intercambio de aniones o cationes convencionales).

15 En otras realizaciones, el kit comprende el agente fijado a un sustrato y otros reactivos útiles en un ELISA. En algunas realizaciones, el kit comprende un recipiente estéril que contiene una composición celular terapéutica o profiláctica; recipientes de este tipo pueden ser cajas, ampollas, botellas, viales, tubos, bolsas, bolsitas, envases blíster, u otras formas de recipientes apropiados conocidos en la técnica. Recipientes de este tipo pueden estar hechos de plástico, vidrio, papel laminado, película de metal, u otros materiales adecuados para contener medicamentos.

20 Si se desea, el kit incluye instrucciones para utilizar el kit para detectar la unión del auto-anticuerpo a la proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMGCR) o un fragmento de la misma. Las instrucciones incluirán generalmente información sobre el uso de la composición para el diagnóstico de una enfermedad autoinmune, miopatía asociada con una respuesta autoinmune asociada con la terapia con estatinas, y miopatía necrotizante. En otras realizaciones, las instrucciones incluyen al menos uno de los siguientes: descripción del agente de unión a HMGCR; precauciones; advertencias; indicaciones; contra- indicaciones; información de sobredosis; reacciones adversas; farmacología de los animales; estudios clínicos; y/o referencias. Las instrucciones se pueden imprimir directamente en el envase (cuando está presente), o como una etiqueta aplicada al recipiente, o como una hoja, folleto, tarjeta o carpeta separada suministrada en o con el recipiente.

25 La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro del ámbito de competencia del experto. Tales técnicas se explican por completo en la bibliografía tal como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gen Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller y Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991). Estas técnicas son aplicables a la producción de los polinucleótidos y polipéptidos utilizados en la invención y, como tales, se pueden considerar en la fabricación y la práctica de la invención. Técnicas particularmente útiles para realizaciones particulares se comentarán en las secciones que siguen.

35 Los siguientes ejemplos se exponen a fin de proporcionar a los expertos ordinarios en la técnica una exposición y descripción completas de cómo hacer y utilizar el ensayo, la detección y métodos terapéuticos descritos, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los autores de la invención consideran como su invención.

#### EJEMPLOS

Ejemplo 1: Un nuevo auto-anticuerpo anti-200/100-kD está presente en suero de pacientes con una miopatía necrotizante.

40 Muestras de biopsia muscular obtenidas de 225 pacientes que presentaban debilidad proximal del músculo, elevados niveles de creatina quinasa (CK) y/o evidencia de miopatía en la electromiografía (EMG) y/u otra evidencia

de enfermedad muscular fueron revisadas con el fin de identificar a aquellos con una miopatía predominantemente necrotizante. No se consideró que pacientes con resultados de la biopsia notables para infiltrados marcados de células inflamatorias, vacuolas ribeteadas (características de miositis de cuerpos de inclusión), atrofia perifascicular (patognomónico de la dermatomiositis (DM), u otros rasgos característicos de un diagnóstico específico tuvieran una miopatía predominantemente necrotizante.

En total, treinta y ocho pacientes (17% del total) fueron identificados como que tenían una miopatía predominantemente necrotizante en la biopsia muscular. De ellos, una enfermedad muscular específica fue diagnosticada de forma definitiva en doce pacientes, utilizando métodos de ensayo existentes. Diez pacientes tenían miopatías autoinmunes tal como se define por la presencia de auto-anticuerpos antisintetasa (uno con anti-Jo-1, dos con anti-PL-12 y uno con anti-PL-7) o por la presencia de auto-anticuerpos anti-partícula de reconocimiento de señal (SRP) (seis pacientes); cada uno de estos pacientes también tenía una respuesta definida positiva a la terapia inmunosupresora. Además, un paciente tenía una miopatía necrotizante asociada con hipotiroidismo profundo y otro tenía distrofia muscular de cinturas de tipo 2B (es decir, disferlinopatía), que fue confirmada más tarde por pruebas genéticas. El resto de los veinte y seis pacientes (~ 10% de la cohorte original) tenía una miopatía predominantemente necrotizante de etiología poco clara.

Sueros recogidos de los veintiséis pacientes descritos anteriormente fueron rastreados en cuanto a la presencia de nuevos auto-anticuerpos. Sorprendentemente, se encontró que los sueros de dieciséis de estos pacientes (62%) habían inmunoprecipitado un par de proteínas a partir de extractos de células HeLa marcados radiativamente con tamaños aproximados de 200 kd y 100 kd, respectivamente (Figura 1). Estas proteínas, con pesos moleculares que no corresponden a los de auto-antígenos específicos de miositis conocidos, siempre se inmunoprecipitaron como un par. Aunque fueron reproducibles inmunoprecipitaciones de auto-anticuerpos anti-200/100-kD, ningún suero detectó proteínas de 200-kD o 100-kD cuando se utilizaba para la inmunotransferencia de extractos de células HeLa.

Con el fin de evaluar la especificidad de estos anticuerpos para un fenotipo necrotizante, se sometió a ensayo la inmunorreactividad de auto-anticuerpos anti-200/100 para la cohorte restante. Entre los 187 pacientes que no padecían una miopatía necrotizante predominante, el suero de sólo 1 paciente (0,5%) inmunoprecipitó las proteínas de 200-kd y 100-kd, demostrando que este hallazgo es altamente específico para aquellos pacientes con una miopatía necrotizante ( $P < 10^{-15}$  mediante el ensayo exacto de Fisher). Ninguno de los sueros de los 12 pacientes con miopatías necrotizantes asociadas a afecciones previamente conocidas, incluyendo los 6 pacientes con anticuerpos anti-SRP, inmunoprecipitaba proteínas con pesos moleculares de 200 kd o 100 kd.

Varios de los sueros auto-anticuerpos anti-200/100-kD positivos inmunoprecipitaron proteínas adicionales. Por ejemplo, el suero del paciente 8089 inmunoprecipitó una proteína de ~ 70 kD, así como las proteínas de 200-kD y 100-kD (Figura 1, pista 2). Es de señalar que cada una de las proteínas adicionales fue reconocida por no más de 1 de los 16 sueros de pacientes con positividad auto-anticuerpo anti-200/100. Además de ello, ninguna de las bandas adicionales reconocidas por cualquiera de los auto-anticuerpos anti-200/100-kD positivos correspondía en tamaño a auto-antígenos específicos de miositis previamente reconocidos, incluyendo proteínas con pesos moleculares de 72-kD, 54-kD y/o 21-kD, como se ve en pacientes con miopatía de partículas de reconocimiento anti-señal.

Ejemplo 2: El uso de estatinas se correlaciona estadísticamente con positividad de auto-anticuerpos anti-200/100-kD

Se analizaron la información demográfica, los hallazgos de laboratorio, los patrones de debilidad, imágenes por resonancia magnética (MRI) del muslo y otras características clínicas de los dieciséis pacientes auto-anticuerpos anti-200/100-kD positivos con una miopatía necrotizante (Tabla 1). El único paciente que tenía especificidad de auto-anticuerpos anti-200/100-kD con una miopatía predominantemente necrotizante se excluyó de este análisis (Tabla 1).

Tabla 1: Características clínicas de los pacientes con auto-anticuerpos anti-200/100-kD

Demografía	
Número de pacientes	16
Edad media en el brote de la enfermedad (años)	54
Sexo femenino	63%
Raza blanca	56%
Raza no blanca	44%
Fallecidos	0%
Rasgos clínicos	
Debilidad muscular subjetiva	100%
Debilidad proximal tras el examen	100%

Uso de silla de ruedas	25%
Enfermedad pulmonar intersticial	0%
Tumores malignos	13%
Fenómeno de Raynaud	13%
Sarpullido	44%
Mialgias	75%
Artralgias	50%
Disfagia	63%
Uso de estatinas	63%
Hallazgos de laboratorio	
Nivel inicial de creatina fosfoquinasa, media (UI/litro)	8.702
Nivel máximo de creatina quinasa, media (UI/litro)	10.333
Anticuerpo antinuclear positivo (> 1:160)	6%
Tasa de sedimentación de eritrocitos elevada	38%
Nivel de proteínas C-reactivas elevado	6%
Anti-Ro positivo	0%
Anti-La positivo	0%
Rasgos de MRI del muslo	
Hallazgos normales tras MRI del muslo	0%
Edema muscular	100%
Atrofia	75%
Sustitución grasa	67%
Edema fascial	25%
Hallazgos por electromiografía (EMG)	
Miopatía irritable	88%
Miopatía no irritable	13%
Normal	0%

\* Excepto cuando se indique lo contrario, los valores son el porcentaje. CPK = creatina fosfoquinasa; CK = creatina quinasa; ANA = anticuerpo antinuclear; ESR = velocidad de sedimentación de eritrocitos; MRI = Formación de imágenes por resonancia magnética; EMG = electromiografía

5 Los hombres y las mujeres estaban representados en números casi iguales y tenían una edad media de 54 años en el brote de la enfermedad. Todos los dieciséis pacientes informaron de resistencia previamente normal, con un brote agudo o subagudo de la debilidad muscular que se produce en edad adulta. En el momento de la evaluación inicial, todos los pacientes tenían debilidad muscular proximal, evidencia de edema muscular en la RMI muslo bilateral y niveles de creatina quinasa acusadamente elevados, con un valor medio de 10.333 UI/litro (intervalo 3.052-24.714).  
10 Cada una de las dieciséis electromiografías (EMGs) disponibles para su revisión reveló rasgos de miopatía. Catorce de los dieciséis pacientes (88%) demostró una miopatía irritable, mientras que las dos miopatías restantes eran no irritables.

Otros rasgos clínicos destacados incluían mialgias en 12 (75%) de 16 pacientes, artralgias en 8 (50%) de 16 pacientes y disfagia en 10 (63%) de 16 pacientes. Sólo 2 (13%) de 16 pacientes tenían el fenómeno de Raynaud. Aunque 7 (44%) de 16 pacientes reseñó un sarpullido no específico, ningún paciente tuvo rasgos cutáneos compatibles con DM en el examen o informe histórico. Ninguno de estos pacientes tenía anticuerpos contra antígenos nucleares extraíbles detectados por los laboratorios clínicos (incluyendo anti-Ro, anti-La, anti-RNP y anti-Scl-70) y ningún paciente cumplía los criterios para otra enfermedad del tejido conjuntivo. Dos pacientes tenían tumores malignos previas: 1 tenía cáncer de ovario no recurrente tratado 5 años antes del brote de la enfermedad muscular y el otro tenía cáncer de próstata que estaba en remisión clínica después del tratamiento.

20 Ninguno de los pacientes con auto-anticuerpos anti-200/100 positivos tenía un historial familiar de enfermedad muscular. Además de ello, el aleteo de la escápula, una debilidad facial, una debilidad asimétrica, u otros rasgos distintivos sugestivos de enfermedad muscular hereditaria estaban ausentes en cada uno de estos pacientes.

25 De señalar, 10 (63%) de 16 pacientes habían estado expuestos a la terapia con estatinas antes de la aparición de debilidad. La media  $\pm$  desviación estándar (SD) de duración del tratamiento con estatinas antes de la aparición de los síntomas musculares fue de  $31,3 \pm 27,4$  meses (intervalo 0 - 84 meses). En cada caso, la interrupción de la medicación con estatinas no condujo a una clara mejoría clínica, y el período de tiempo medio  $\pm$  SD entre la interrupción de estatinas y la biopsia muscular fue de  $5,2 \pm 4,6$  meses (intervalo 1-14 meses). Una revisión de los registros de los pacientes no reveló otras exposiciones potenciales a miotoxina.

Para determinar si la asociación con el uso de estatinas fue una coincidencia, se analizó/evaluó la frecuencia de uso de estatinas en otros grupos de pacientes con miositis (Tabla 2).

Tabla 2: Frecuencia de uso de estatinas en pacientes con diferentes formas de enfermedad muscular

Grupo	Frecuencia del uso de estatinas	Edad media $\pm$ SD de los pacientes (años)
Todos los pacientes con anticuerpos anti-200/100-kD	10 de 16 (62,5%)	57,8 $\pm$ 14,8
Pacientes de DM	5 de 33 (15,2%) <sup>†</sup>	51,0 $\pm$ 12,2
Pacientes de PM	7 de 38 (18,4%) <sup>†</sup>	49,1 $\pm$ 14,1 <sup>‡</sup>
Pacientes de IBM	11 de 31 (35,5%) <sup>†</sup>	67,7 $\pm$ 9,9 <sup>‡</sup>
Todos los pacientes con anticuerpos anti-200/100-kD de $\geq$ 50 años de edad	10 de 12 (83,3%)	64,4 $\pm$ 9,2
Pacientes de DM de $\geq$ 50 años de edad	4 de 16 (25%) <sup>†</sup>	61,0 $\pm$ 8,3
Pacientes de PM de $\geq$ 50 años de edad	7 de 19 (36,8%) <sup>†</sup>	60,4 $\pm$ 7,6
Pacientes de IBM de $\geq$ 50 años de edad	10 de 30 (33,3%) <sup>†</sup>	68,4 $\pm$ 9,2

DM: dermatomiositis, MP: polimiositis e IBM: miositis de cuerpos de inclusión.

5 <sup>†</sup>  $P < 0,05$  frente a pacientes que tienen anticuerpos anti-200/100-kD, mediante el test de chi-cuadrado.

<sup>‡</sup>  $P < 0,05$  frente a pacientes de  $\geq 50$  años de edad que tienen anticuerpos anti-200/100-kD, mediante test  $t$  de Student.

10 5 (15,2%) de 33 pacientes con DM, 7 (18,4%) de 38 pacientes con PM y 11 (35,5%) de 31 pacientes con IBM habían sido tratados con estatinas antes de someterse a una biopsia muscular; la frecuencia de uso de estatinas se incrementó significativamente ( $P < 0,05$ ) en el grupo de auto-anticuerpos anti-200/100 positivos en comparación con los dos grupos DM y PM. Sin embargo, en este análisis, no hubo diferencia significativa en el uso de estatinas entre el grupo de pacientes con positividad de auto-anticuerpos anti-200/100 y el grupo con IBM ( $P = 0,08$ ). Dado que los pacientes de edad avanzada son más propensos a ser tratados con estatinas, se evaluaron las edades de los pacientes con diferentes formas de miositis. En comparación con todos los pacientes auto-anticuerpos anti-200/100 positivos, que tenían una edad media  $\pm$  SD de 57,8  $\pm$  14,8 años, el grupo total de pacientes con IBM era significativamente mayor, con una edad media  $\pm$  SD de 67,7  $\pm$  9,9 años. Cuando en el análisis sólo se incluyeron aquellos pacientes de 50 o más años de edad, 10 (83,3%) de 12 pacientes auto-anticuerpos anti-200/100 positivos, 4 (25%) de 16 pacientes con DM, 7 (36,8%) de 19 pacientes con PM y 10 (33,3%) de 30 pacientes con IBM habían estado expuestos a las estatinas (Tabla 2). En esta comparación de emparejamiento de edad, el tratamiento con estatinas era significativamente superior en la población de auto-anticuerpos anti-200/100 positivos en comparación con las poblaciones de DM ( $P = 0,002$ ), PM ( $P = 0,011$ ) e IBM ( $P = 0,003$ ).

25 Hubo una variación notable en el fenotipo clínico, oscilando desde un paciente tetrapléjico, intubado crónicamente, a varios pacientes que tenían sólo una debilidad leve. Un rasgo único en la mayoría de los pacientes era su conservación relativa de resistencia a pesar de niveles acusadamente elevados de enzimas musculares. Sin embargo, los registros médicos de varios pacientes mostraron un nivel enzimático aparente muscular umbral (generalmente entre 3.000 y 7.000 UI/litro) por encima del cual se produjo debilidad.

Ejemplo 3: Las miopatías experimentadas por pacientes auto-anticuerpos anti-200/100-kD positivos responden a una terapia inmunosupresora

30 Los regímenes de medicación y las respuestas al tratamiento (basados en mejoras objetivas en la resistencia) eran variables. Están disponibles las características clínicas de los 16 pacientes auto-anticuerpos anti-200/100 positivos. De los 14 pacientes que fueron seguidos longitudinalmente, 9 (64%) tuvieron una respuesta completa o casi completa a la inmunosupresión y 5 (36%) tuvieron una respuesta parcial a la inmunosupresión. Estos 5 pacientes incluían 1 paciente cuya progresiva debilidad muscular se estabilizó, pero no mejoraron con la inmunosupresión. Seis (43%) de los 14 pacientes experimentó una recaída cuando se disminuyó gradualmente o se retiró la medicación inmunosupresora. Siete (60%) de los 14 pacientes están actualmente en fase de reducción de sus medicamentos inmunosupresores y no han experimentado una recaída hasta la fecha. Sólo 1 paciente tuvo una reducción completa de medicaciones inmunosupresoras sin experimentar una recaída de debilidad.

Tabla 3: Regímenes de medicación y respuestas al tratamiento de dieciséis pacientes con anti-auto-anticuerpos 200/100-kD

Suero n°	Edad en brote (años)	Sexo	Raza	Estatina	CPK más alto	CPK reciente	Tratamiento	¿Mejora con IS?	¿Recaída de síntomas con retirada de IS?	Duración de IS (meses)	Meses con estatina antes brote enfermedad muscular	Meses totales con estatina	Meses entre suspensión de estatina y biopsia muscular
3004	59	M	No blanca	Sí	24714	2908	P, MTX, RTX, AZA	Casi Completa	Sí	74	39	42	1
6031	71	M	Blanca	Sí	3052	55	P, MTX	Completa	Sí	36	47	53	2
7109	46	F	No blanca	No	11200	477	P, AZA, MMF, MTX, IVIG, CYC, RTX	Parcial	Sí	99	N/A	N/A	N/A
8001	74	F	Blanca	Sí	8602	309	P, MTX, AZA	Casi Completa	N/A	24	34	41	4
8024	33	F	No blanca	No	7225	7940	P, AZA, MMF	Casi Completa	Sí	30	N/A	N/A	N/A
8040	58	F	No blanca	Sí	3993	895	P	LTF	Desconocida	2	3	5	9
8050	22	F	No blanca	No	17967	11120	P, MTX, IVIG, RTX, MMF	Parcial	N/A	18	N/A	N/A	N/A
8076	71	M	Blanca	Sí	8800	48	P, MTX, IVIG	Completa	N/A	17	84	85	2
8089	48	F	No blanca	Sí	17000	1225	P, MTX, RTX	Casi Completa	N/A	19	Desconocidos	Desconocidos	11
8100	56	F	Blanca	Sí	8000	1870	P, AZA, MMF, MTX, IVIG, FK506, RTX	Casi Completa	Sí	31	12	16	2
8109	68	M	Blanca	No	3275	146	P, HCQ, MTX, IVIG	Parcial	Sí	15	N/A	N/A	N/A

Suero n°	Edad en brote (años)	Sexo	Raza	Estatina	CPK más alto	CPK reciente	Tratamiento	¿Mejora con IS?	¿Recalida de síntomas con retirada de IS?	Duración de IS (meses)	Meses con estatina antes brote enfermedad muscular	Meses totales con estatina	Meses entre suspensión de estatina y biopsia muscular
8126	41	F	No blanca	No	13506	1073	P, RTX	Completa	N/A	14	N/A	N/A	N/A
8130	63	M	Blanca	Sí	16500	LTF	P, AZA	LTF	Desconocida	16	Desconocidos	Desconocidos	1
8176	66	F	Blanca	Sí	6000	410	P, AZA, RTX	Parcial	N/A	17	0	15	6
8209	45	F	Blanca	No	8500	160	P, MTX, AZA	Casi Completa	No	21	N/A	N/A	N/A
8227	46	M	Blanca	Sí	7000	2048	P, MTX	Parcial	N/A	11	31	31	14

P: prednisona; AZA: azatioprina; MTX: metotrexato; IVIG: inmunoglobulina intravenosa; MMF: micofenolato mofetil; CYC: ciclosporina; RTX: rituximab; FK506: tacrolimus, HCQ: hidroxicloroquina; y LTF: perdida durante el seguimiento.

- 5 La mayoría de los pacientes tuvieron una respuesta inicial muy modesta a la prednisona y requirieron terapia inmunosupresora de combinación. Rituximab e inmunoglobulina intravenosa eran adjuntos valiosos cuando se añadían a prednisona y azatioprina o metotrexato. La mayoría de los pacientes requirieron alguna dosis de prednisona durante la terapia de mantenimiento e informaron sobre debilidad con la reducción de esteroides, incluso si su respuesta inicial al tratamiento con prednisona era sólo modesta.
- 10 Ejemplo 4: La miopatía necrotizante asociada con positividad de auto-anticuerpos anti-200/100-kD tiene rasgos característicos de miopatías inmunomediadas.

Dieciséis (94%) de 17 pacientes con auto-anticuerpos anti-200/100 tenían muestras de biopsias musculares que muestran una necrosis miofibril prominente; la muestra de biopsia restante del paciente era notable para extensos infiltrados inflamatorios, y un subsiguiente análisis no incluía los resultados de esta biopsia. A pesar de que un examen minucioso reveló colecciones endomisiales y/o perivasculares de células inflamatorias en 5 (31%) de las 16 muestras de biopsia muscular, el grado de inflamación era leve en comparación con el observado en las muestras de biopsia muscular típicas obtenidas de pacientes con PM o DM. Ninguna muestra de biopsia obtenida de un paciente con positividad de auto-anticuerpos anti-200/100 reveló evidencia de más de una denervación leve, y ninguna muestra de biopsia era positiva para la acumulación de glucógeno anormal o la deposición de amiloides.

20 De los 16 pacientes con miopatías necrotizantes que eran auto-anticuerpos anti-200/100 positivas, estaban disponibles muestras congeladas de tejido muscular obtenidas de 8 pacientes para su posterior análisis. Para evaluar la morfología de los vasos sanguíneos, las secciones se tiñeron con anticuerpos anti-CD31. Se observaron capilares endomisiales anormalmente agrandados con paredes engrosadas en 5 (63%) de 8 muestras de biopsia (flechas en la Figura 2B). Sin embargo, la densidad de capilares en el tejido muscular no estaba notablemente reducida en ninguna de las muestras de biopsia muscular.

La deposición del complemento fue evaluada por tinción de las muestras de biopsia muscular auto-anticuerpos anti-200/100 positivas disponibles con anticuerpos que reconocen el complejo de ataque a la membrana. Aunque los capilares endomisiales no fueron reconocidos definitivamente por el anticuerpo (Figura 3D), en 6 (75%) de 8 muestras de biopsia muscular, se tiñeron pequeños vasos perimisiales (Figuras 3A y 3B). En contraposición, los vasos sanguíneos de muestras de biopsia muscular control no se teñían intensamente con anticuerpos del complejo de ataque a la membrana. Como era de esperar, la deposición del complejo de ataque a la membrana también estaba presente en miofibras necróticas y degenerativas; esto se consideró un hallazgo inespecífico. Sin embargo, en 4 (50%) de 8 de las muestras de biopsia muscular auto-anticuerpos anti-200/100 positivas, las superficies sarcolemas de fibras musculares no necróticas dispersadas, teñidas en positivo para el complejo de ataque a la membrana (Figuras 3C y D); tal como se muestra, algunas de estas células musculares eran relativamente pequeñas, lo que sugiere que podrían estar regenerando fibras.

La tinción de muestras de biopsia muscular de auto-anticuerpos anti-200/100 positivas con anticuerpos que reconocen MHC clase I demostró que el sarcolema de 4 (50%) de 8 muestras era claramente MHC de clase I positivo (Figura 4). Varios otros tenían una tinción límite de MHC clase I, pero esto apareció considerablemente menos intenso que la observada en las muestras de biopsia muscular de pacientes Jo-1-positivos con PM que se incluyeron como controles positivos en el mismo experimento.

Las miopatías autoinmunes (a las que se alude colectivamente como miositis) son una familia de afecciones caracterizadas clínicamente por debilidad muscular simétrica proximal, niveles elevados de creatina quinasa sérica y hallazgos miopáticos en electromiografía (Dalakas MC, *et al*, *Lancet* 2003; 362: 971-82 y Mammen AL. *Ann NY Acad Sci* 2010; 1184:134-53). Aunque otras afecciones musculares pueden provocar síndromes clínicos similares, el diagnóstico de un trastorno autoinmune conlleva importantes implicaciones terapéuticas y de pronóstico, ya que sólo estos trastornos responden habitualmente a la terapia inmunosupresora.

Al igual que con otras enfermedades autoinmunes sistémicas, una fuerte asociación de auto-anticuerpos con fenotipos clínicos distintos se observa en pacientes con miopatía autoinmune. Por ejemplo, los auto-anticuerpos dirigidos contra aminoacil-ARN de transferencia (ARNt) sintetasas son los auto-anticuerpos específicos de miositis más frecuentes (MSAs) y se observan en ~ 20% de los pacientes con miositis (Targoff IN, *et al.*, *Rheum Dis Clin North Am* 2002;28:859-90, viii). Estos y auto-anticuerpos que reconocen otras ARNt sintetasas se asocian con una constelación específica de rasgos clínicos que incluyen la enfermedad pulmonar intersticial, fenómeno de Raynaud, artritis y un hallazgo cutáneo característico conocido como manos de mecánico (Yoshida S, *et al.*, *Arthritis Rheum* 1983;26:604-11; Marguerie C, *et al.*, *QJ Med* 1990;77:1019-38). Pese a que el rastreo de auto-anticuerpos puede desempeñar un papel significativo en el diagnóstico de la enfermedad muscular inmunomediada, no siempre se observan anticuerpos de este tipo.

La presencia de infiltrados inflamatorios en muestras de biopsia muscular es otra característica bien reconocida de las miopatías autoinmunes (Dalakas MC, *et al.*, 2003). Sin embargo, las muestras de biopsia muscular de algunos pacientes con miopatías autoinmunes contienen, en todo caso, pocos infiltrados de células inflamatorias. Por ejemplo, pacientes con auto-anticuerpos específicos de miositis (MSAs) dirigidos contra componentes de la SRP tienen muestras de biopsia que son notables para células musculares degenerantes, necróticas y regenerantes sin extensos infiltrados de células inflamatorias (Miller T, *et al.*, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;73:420-8; Kao AH, *et al.*, *Arthritis Rheum* 2004; 50:209-15; Hengstman GJ, *et al.*, *Ann Rheum Dis* 2006;65:1635-8; y Dimitri D, *et al.*, *Muscle Nerve* 2007; 35:389-95). Por consiguiente, es probable que los pacientes con miopatías necrotizantes de lo contrario no diagnosticadas también puedan tener auto-anticuerpos únicos que podrían ser utilizados para el diagnóstico.

Entre un grupo de 225 pacientes con miopatías, treinta y ocho tenían muestras de biopsia muscular con miopatías predominantemente necrotizantes. Después de extensos ensayos de laboratorio, las condiciones específicas podrían ser diagnosticadas en doce de estos pacientes; éstos eran en su mayoría pacientes con anti-partícula de reconocimiento de señal (SRP) o miositis anti-sintetasa. Los sueros de los restantes veintiséis pacientes fueron rastreados en cuanto a la presencia de nuevos auto-anticuerpos y observó que dieciséis de estos sueros inmunoprecipitaron un par de proteínas con pesos moleculares aproximados de 200 kD y 100 kD, respectivamente. Además, entre los otros 187 pacientes, un paciente con una muestra de biopsia que muestra abundantes infiltrados de células inflamatorias compartió esta inmunoespecificidad. Los pacientes con auto-anticuerpos anti-200/100-kD no tenían otros auto-anticuerpos conocidos, incluyendo anti-SRP. Por lo tanto, auto-anticuerpos anti-200/100-kD caracterizan un subconjunto único de pacientes con miopatías, representando dieciséis de los veinte y seis pacientes (62%) con miopatías idiopáticas necrotizantes.

En muchos aspectos, los rasgos clínicos de los pacientes con inmunoespecificidad de auto-anticuerpos anti-200/100-kD son similares a los de los pacientes con otras formas de miopatía inmunomediada; ambos grupos experimentaron típicamente el brote sub-agudo de debilidad muscular proximal con elevados niveles de creatina quinasa, tenían resultados de miopatía irritable en electromiografía, evidencia de edema en MRI y, en la mayoría de los casos, una respuesta clara a la terapia inmunosupresora. Sin embargo, había varios rasgos únicos de los pacientes auto-anticuerpos anti-200/100-kD-positivos. En primer lugar, varios pacientes tenían niveles muy altos de creatina quinasa (en el intervalo de 3.000-8.000 UI/litro) pero sólo una debilidad muscular mínima. Esto indica que, o bien existe una capacidad inusual de estos pacientes para regenerar músculo con eficacia suficiente para mantener el ritmo de la destrucción muscular extensiva o que estos pacientes tienen una anomalía de la membrana muscular que permite la fuga de creatina quinasa sin provocar debilidad; una anomalía de este tipo podría ser consistente con el hallazgo de la deposición del complejo de ataque a la membrana tras el sarcolema de las fibras musculares no necróticas. En segundo lugar, en > 60% de estos pacientes, la exposición a la terapia con estatinas precedió al desarrollo de síntomas musculares, que persistieron mucho después de suspender el tratamiento con la miotóxina. De manera importante, esta asociación era más fuerte en pacientes de edad avanzada; más del 80% de pacientes

auto-anticuerpos anti-200/100 kD-positivos con edades de 50 años o más habían estado expuestos a las estatinas. Esta tasa fue significativamente más alta que las tasas de tratamiento con estatinas en grupos emparejados en edad de pacientes con polimiositis, dermatomiositis o miositis por cuerpos de inclusión.

5 Aunque los pacientes auto-anticuerpos anti-200/100 kD-positivos comparten determinados rasgos con las poblaciones bien descritas de pacientes con anticuerpos anti-SRP, dos hallazgos claves distinguen a estos grupos como algo distinto. En primer lugar, los sueros de pacientes con auto-anticuerpos anti-200/100-kD no reconocían ninguna de las subunidades de partícula de reconocimiento de señal, y sueros de pacientes con auto-anticuerpos anti-SRP no reconocían proteínas con pesos moleculares de ~ 200 kD o ~ 100 kD. Estas observaciones demuestran que pacientes con la especificidad de auto-anticuerpos anti-200/100-kD son inmunológicamente distintos de la población de pacientes con anticuerpos anti-SRP. En segundo lugar, varios pacientes auto-anticuerpos anti-200/100-positivos que tenían niveles extremadamente altos de CK, tenían sólo una debilidad mínima. Esto fue inusual, debido a que los pacientes con anticuerpos anti-SRP con niveles elevados de CK son típicamente uniformemente muy débiles.

15 Para caracterizar adicionalmente la enfermedad muscular en pacientes con auto-anticuerpos anti-200/100, muestras de biopsia muscular se tiñeron con anticuerpos contra complejo de ataque a la membrana, marcadores de células endoteliales y MHC de clase I. La deposición de complejos de ataque a la membrana representa la etapa final de la cascada del complemento y puede indicar que el tejido está destinado a la destrucción por el sistema inmune. La deposición del complejo de ataque a la membrana sobre capilares endomisiales ha sido demostrada en pacientes con dermatomiositis (Kissel JT *et al.*, *N Engl J Med* 1986;314:329-34 y Emslie-Smith AM *et al.*, *Ann Neurol* 1990; 27:343-56) y en tres de cuatro análisis de muestras de biopsia positivas para anti-SRP (Miller T, *et al.*, 2002; Kao AH, *et al.*, 2004; Hengstman GJ, *et al.*, 2006; y Dimitri D, *et al.*, 2007); esto no ocurre en las distrofias musculares (Spuler S *et al.*, *Neurology* 1998; 50:41-6). Aunque la deposición de complejos de ataque a la membrana no se observó en capilares endomisiales en muestras de biopsia obtenidas de pacientes con auto-anticuerpos anti-200/100-kD, en cinco de las ocho muestras, los capilares endomisiales estaban anormalmente engrosados y ampliados. Anomalías morfológicas similares se han descrito tanto en pacientes con anticuerpos anti-SRP como en un grupo de pacientes con "miopatía necrotizante con capilares pipestem". A pesar de que este último grupo comparte algunos rasgos patológicos con pacientes con auto-anticuerpos anti-200/100-kD y anticuerpos anti-SRP, estos pacientes diferían por tener cualquiera otra enfermedad del tejido conjuntivo o cáncer activo (Emslie-Smith AM y Engel AG, *Neurology* 1991; 41:936-9).

30 A pesar de su ausencia en los capilares, la deposición del complejo de ataque a la membrana en los vasos sanguíneos pequeños perimisiales era evidente en seis (75%) de ocho muestras de biopsia obtenidas de pacientes con auto-anticuerpos anti-200/100-kD. Sin estar ligados a la teoría, es razonable que la deposición del complemento en estos casos puede reflejar un nuevo objetivo vascular en esta población de pacientes. Además, el complejo de ataque a la membrana localizado en la superficie de las fibras no necróticas se observó en 4 (50%) de las 8 muestras de biopsia de pacientes con auto-anticuerpos anti-200/100 que se analizaron. A pesar de que la presencia del complejo de ataque a la membrana de fibras no necróticas había sido previamente reseñado en miopatías inmunomediadas (Oxenhandler R, *et al.*, *Hum Pathol* 1982; 13:745-57), esto no es una característica general de estos trastornos; en múltiples estudios de miopatía anti-SRP, un complejo de ataque a la membrana se observó en fibras no necróticas en sólo una de siete (Miller T, *et al.*, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 73:420-8), ninguno de seis (Hengstman GJ, *et al.*, 2006) y una de tres (Dimitri D, *et al.*, *Muscle Nerve* 2007; 35:389-95) muestras de biopsia muscular. Cabe señalar que también se ha reseñado que la deposición del complejo de ataque a la membrana en miofibras no necróticas se produce en algunas distrofias (Spuler S, *et al.*, *Neurology* 1998; 50:41-6), y que la deposición del complejo de ataque a la membrana en los vasos sanguíneos y las fibras musculares puede ser un daño secundario a la membrana en lugar de un evento patológico primario.

45 Finalmente, cuatro de las ocho muestras de biopsia disponibles incluían miofibras con tinción sarcolemal de MHC de clase I. Este es un rasgo característico de las miopatías inmunomediadas y es raro o está ausente en muestras de biopsia de pacientes con distrofias musculares y otros trastornos musculares y nerviosos (Van der Pas J, *et al.*, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75:136-9 y Sundaram C, *et al.*, *Neurol India* 2008; 56:363-7). En comparación, los resultados de los estudios de evaluación de la tinción de MHC de clase I en pacientes con anticuerpos contra SRP han sido mixtos; un estudio señaló fibras de MHC de clase I-positivas en dos de tres pacientes (Dimitri D, *et al.*, 2007), un segundo estudio demostró estas fibras en tres de seis pacientes (Miller T, *et al.*, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 73:420-8), y un tercer estudio demostró las fibras en ninguno de los seis pacientes (Hengstman *et al.*, 2006).

55 Curiosamente, dos informes recientes describen pacientes en los que se desarrolló una miopatía necrotizante durante el tratamiento con estatinas y progresó a pesar de la suspensión de la medicación miotóxica (Needham, *et al.*, *Neuromuscul Disord* 2007; 17:194-200 y Grable-Esposito *et al.*, *Muscle Nerve* 2010; 41:185-90). En el mayor de

los dos informes, Grable-Esposito *et al.*, describían veinticinco pacientes que experimentaron el desarrollo de una miopatía necrotizante, aparentemente inmunomediada, asociada a estatinas, que comparte muchos de los rasgos clínicos observados en la cohorte de pacientes con auto-anticuerpos anti-200/100-kD positivos. Por ejemplo, este grupo de pacientes tenía debilidad muscular proximal, incluidos hombres y mujeres en números casi iguales, tenía un nivel de creatina quinasa medio de 8.203 UI/litro, requería múltiples medicaciones inmunosupresoras para lograr una resistencia mejorada y experimentaba una recaída tras la reducción de las medicaciones inmunosupresoras. Las muestras de biopsia muscular de ocho pacientes similares fueron analizadas en detalle por Needham y colaboradores (Needham, *et al.*, 2007). Considerando que todas las muestras de biopsia descritas en Needham, *et al.*, había aumentado la expresión de MHC de clase I en la superficie de las fibras musculares no necróticas, sólo cuatro de los ocho pacientes auto-anticuerpos anti-200/100-kD positivos descritos en esta memoria eran positivos para la tinción de MHC de clase I.

En conclusión, los resultados reseñados arriba en esta memoria identifican un grupo de pacientes con una miopatía necrotizante y una nueva especificidad de auto-anticuerpos anti-200/100. Curiosamente, el desarrollo de este fenotipo se asocia con la exposición a las medicaciones de estatinas. Además de la presencia de auto-anticuerpos, todos los pacientes respondieron a la inmunosupresión, y muchos experimentaron un brote de debilidad cuando se redujo gradualmente este tratamiento. Estos hallazgos tienden a indicar la presencia de una miopatía inmunomediada en estos sujetos. La presencia de MHC de clase I en la superficie de fibras no necróticas también sustenta que este proceso está inmunomediado. De hecho, los pacientes con miopatías necrotizantes y auto-anticuerpos anti-200/100 muy probablemente tienen una enfermedad autoinmune que debería ser tratada con la medicación inmunosupresora.

Ejemplo 5: Sobre-regulación de la expresión de auto-antígenos de 200 kd y 100 kd por las estatinas.

Tal como se reseñó arriba en esta memoria, los sueros de un grupo de pacientes con IMNM inmunoprecipitan proteínas de -200-y -100-kd de extractos HeLa radio-marcados.

Dada la fuerte asociación del uso de estatinas con el desarrollo de estos auto-anticuerpos anti-200/100-kd, células HeLa fueron marcadas con <sup>35</sup>S-metionina/cisteína después del tratamiento previo durante 24 horas, ya sea con mevinolina 10 pM o vehículo (DMSO) solo. Para validar la equivalencia de proteínas de estos lisados, se realizaron inmunoprecipitaciones utilizando anticuerpos contra Mi-2 o PM-Scl. Como se anticipó, se detectaron cantidades iguales de Mi-2 y los 5 componentes de la proteína del complejo PM-Scl en cada uno de los tipos de lisado. En contraposición, niveles incrementados 3 veces tanto de la proteína de 200-kd como de la de 100-kd se inmunoprecipitaron a partir de las células tratadas con mevinolina, demostrando que los niveles de estos auto-antígenos están sobre-regulados por las estatinas (Figura 5A).

Goldstein y Brown (Goldstein JL y Brown MS *Nature* 1990; 343:425-30) originalmente demostraron que la expresión de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (abreviada como HMG-CoA reductasa o como HMGCR) está sobre-regulada mediante el tratamiento con estatinas. Morikawa y colaboradores (Morikawa S *et al.*, *J Atheroscler Thromb* 2005; 12:121-31) extendieron estos hallazgos a las células musculares. Utilizaron el análisis de micromatrices de ADN para demostrar que las estatinas inducen la expresión de diecinueve genes en una línea celular del músculo esquelético humano, la mayoría de los cuales están relacionados con la biosíntesis del colesterol. Entre éstas, HMG-CoA reductasa se seleccionó como un candidato para el auto-antígeno de 100-kD debido a su peso molecular de 97-kd.

HMGCR marcada con <sup>35</sup>S-metionina se generó mediante (IVTT) y se utilizó en un ensayo de inmunoprecipitación con suero de 16 pacientes con auto-anticuerpos anti-200/100-kd, así como suero de 6 sujetos control negativos, que consisten en 3 pacientes de DM y 3 individuos normales sin exposición a estatinas. Las muestras de suero de pacientes anti-200/100-kd-positivos inmunoprecipitaron HMGCR, mientras que muestras de suero de los grupos control no lo hicieron (Figura 5B).

Ejemplo 6: Los auto-anticuerpos anti-200/100-kD reconocen un fragmento C-terminal de la HMG-CoA reductasa.

HMG-CoA reductasa es una proteína de la membrana con un pequeño dominio extracelular, siete dominios que abarcan a la membrana y un dominio catalítico intracelular. Para definir la o las regiones de la proteína reconocida por los sueros de pacientes con anticuerpos anti-HMGCR, se sintetizaron proteína HMGCR de longitud completa, marcada con <sup>35</sup>S-metionina, un fragmento N-terminal que incluye los dominios extracelulares y que abarcan a la membrana (aa 1-377) y un fragmento C-terminal que incluye la porción intracelular de la molécula (aa 340-888). El suero de pacientes anti-HMGCR-positivos inmunoprecipitó consistentemente HMGCR de longitud completa y el fragmento C-terminal, pero no el fragmento N-terminal (Figura 6). Cuando sueros anti-HMGCR-positivos se

preincubaron con concentraciones crecientes de HMGCR C-terminal no marcada antes de la inmunoprecipitación de proteína HMGCR de longitud completa marcada con <sup>35</sup>S-metionina, se abolió la inmunoprecipitación (Figura 7A). Tomados en conjunto, estos hallazgos demuestran que los auto-anticuerpos anti-HMGCR reconocían la porción C-terminal intracelular de esta enzima.

5 Ejemplo 7: No reconocimiento de la proteína de 200 kd por un auto-anticuerpo único

Para determinar si el suero de pacientes anti-HMGCR-positivos incluye distintos auto-anticuerpos que reconocen la proteína de 200-kd, se realizaron inmunoprecipitaciones de extractos de células HeLa tratadas con mevinolina, marcados con <sup>35</sup>S-metionina, de nuevo preincubando con proteína HMGCR C-terminal purificada (Figura 7B). Este proceso inhibía la inmunoprecipitación tanto de HMGCR como de la proteína de -200-kD, lo que sugiere que la proteína de -200-kD co-inmunoprecipitaba con HMGCR o es un dímero de HMGCR.

Ejemplo 8: Validación de un nuevo ELISA para la detección de auto-anticuerpos anti-HMGCR en sueros de pacientes.

Para rastrear a los pacientes rápidamente en cuanto a auto-anticuerpos anti-HMGCR, se desarrolló un ELISA. Una muestra de suero se definió como positiva para anti-HMGCR si el valor de absorbancia relativa era de 3 desviaciones estándar o más alto que el valor medio en 20 sujetos de control sanos que nunca habían tomado estatinas. Utilizando este método, se encontró que todas las 16 muestras de suero anti-200/100-kd-positivas previamente identificadas por inmunoprecipitación de extractos de células HeLa eran anti-HMGCR positivas. Por el contrario, ninguno de los 33 pacientes con DM (incluyendo 5 que habían tomado previamente estatinas) y ninguno de los 31 pacientes con IBM (incluyendo 11 que habían tomado previamente estatinas) eran anti-HMGCR positivos.

20 A continuación, se utilizó el ELISA de HMGCR para rastrear muestras de suero de todos los 750 pacientes que participaron en un estudio longitudinal de pacientes en el Johns Hopkins Myositis Center entre mayo de 2002 y abril de 2010. De ellos, 45 pacientes (6%) fueron anti-HMGCR positivos mediante ELISA (Tabla 4).

Tabla 4. Rasgos clínicos de los 45 pacientes que fueron positivos para anti-HMGCR mediante ELISA\*

	Suero	Uso de estatina	ELISA HMGCR	Edad en el brote (años)	Sexo	Raza	CK más elevado	Debilidad proximal	EMG	Biopsia muscular	genotipo rs4149056
30	07039	No	0,969	49	M	N	20.000	Sí	No hecha	N + I	
	07056	No	0,749	<40	F	B	6.323	Sí	IM	NM	
	07090	No	1,304	57	M	B	10.310	Sí	IM	NM	
	08024	No	1,123	32	F	N	7.225	Sí	NIM	NM	
	08038	No	0,347	36	M	B	4.071	Sí	NIM	N + I	
35	08050	No	1,260	21	F	N	17.967	Sí	IM	NM	
	08109	No	0,849	68	M	B	3.275	Sí	IM	NM	
	08126	No	1,378	40	F	A	13.506	Sí	IM	N + I	TT
	08196	No	1,524	42	F	N	35.000	Sí	IM	No hecha	TT
	08209	No	0,947	45	F	B	8.500	Sí	IM	NMI	CT
40	09029	No	0,765	4	F	N	16.000	Sí	NIM	NM	TT
	09063	No	0,982	20	F	B	2.000	Sí	n/a	N + I	
	09088	No	0,629	47	F	N	22.733	Sí	IM	n/a	
	10029	No	0,924	16	F	A	16.000	No	Normal	NM	
	09184	No	1,759	38	M	B	17.976	Sí	IM	N + I	
45	03004	Sí	1,259	58	M	N	24.714	Sí	IM	NM	TT
	05017	Sí	1,228	54	M	B	13.600	Sí	No hecha	NM	
	06031	Sí	0,718	71	M	B	3.052	Sí	IM	NM	
	06061	Sí	0,547	54	F	B	15.000	Sí	IM	NM	
	07054	Sí	0,355	43	M	B	11.427	Sí	IM	N + I	
50	07094	Sí	0,948	48	F	B	200	Sí	n/a	No hecha	
	07109	Sí	0,942	44	F	A	11.200	Sí	NIM	NM	
	08001	Sí	0,242	75	F	B	8.602	Sí	IM	NM	
	08040	Sí	1,159	57	F	B	3.993	Sí	IM	NM	
	08076	Sí	1,259	70	M	B	8.800	Sí	IM	NM	CC
55	08089	Sí	0,768	47	F	B	17.000	Sí	IM	NM	TT

	08100	Sí	0,378	57	F	B	8.000	Sí	IM	NM	
	08130	Sí	0,751	62	M	B	16.500	Sí	IM	NM	
	08144	Sí	0,287	65	M	B	254	Sí	No hecha	No hecha	
	08145	Sí	1,411	54	F	B	17.000	Sí	IM	NM	
5	08148	Sí	0,608	65	M	B	5.800	Sí	n/a	N + I	
	08176	Sí	1,142	66	F	B	6.000	Sí	IM	NM	TT
	08227	Sí	0,966	49	M	B	7.000	Sí	NIM	NM	
	09125	Sí	0,517	56	F	B	1.876	Sí	NIM	N + I	
	09135	Sí	0,746	58	F	B	3.000	Sí	NIM	NM	TT
10	09153	Sí	1,273	65	M	B	4.197	Sí	IM	NM	TT
	09170	Sí	0,556	80	F	B	1.200	Sí	NIM	NM	
	09172	Sí	1,495	53	F	B	6.840	Sí	IM	NM	TT
	09176	Sí	1,000	70	M	B	8.800	Sí	IM	NM	TT
	09188	Sí	1,996	65	M	B	4.065	Sí	IM	NM	CT
15	09190	Sí	1,486	49	F	B	3.700	Sí	n/a	NM	TT
	10009	Sí	0,736	66	M	B	5.000	Sí	NIM	NM	TT
	10044	Sí	1,810	62	M	B	11.600	Sí	IM	N + RV	TT
	10062	Sí	0,292	60	F	B	4.000	Sí	n/a	n/a	TT
20	10072	Sí	1,169	54	F	B	4.000	Sí	IM	NM	

\* Los valores de absorbancia listados en la columna "ELISA HMGCR", están en unidades relativas a la absorbancia de una muestra de control positivo arbitraria (muestra 9176). El valor de corte para un resultado positivo en el análisis con enzima unida a inmunosorbente (ELISA) para anticuerpos contra HMG-CoA reductasa (HMGCR) fue 0,215 unidades de absorbancia; este valor equiparado a tres desviaciones estándar por encima de la media de veinte personas sanas que nunca habían tomado estatinas. El uso de estatinas representa el período previo al ensayo de suero. Los valores de creatina quinasa (CK) se expresan como UI/litro. Los hallazgos de electromiografía (EMG) se clasificaron como miopatía irritable (IM) normal o miopatía no irritable (NIM). Los hallazgos de la biopsia muscular se clasificaron como necrosis, más inflamación (N + I), miopatía necrotizante (NM) o necrosis más vacuolas ribeteadas (N + RV). El genotipado para rs4149046 se realizó en diecisiete pacientes anticuerpo anti-HMG-CoA reductasa positivos, para quienes estaban disponibles muestras de ADN, n/a = no aplicable. B = BLANCO, N = NEGRO, A = ASIÁTICO

Para validar el ELISA, se compararon los datos de inmunoprecipitación de ELISA e IVTT obtenidos utilizando un subconjunto de sueros de esta cohorte que se recogieron de 307 pacientes únicos consecutivos entre enero de 2009 y abril de 2010. En este subgrupo, 17 pacientes anti-HMGCR-positivos fueron identificados mediante ambos métodos. El ELISA identificó 1 suero anti-FIMGCR-positivo adicional que era negativo por inmunoprecipitación (suero 10029). Dado que este paciente tenía una miopatía necrotizante con elevados niveles de CK, se determinó que esto era un verdadero suero anti-HMGCR-positivo y no un suero de falso-positivo. Estos resultados demuestran una correlación muy alta entre estos 2 métodos y validar el test ELISA como un rastreo fiable y eficiente para la detección de auto-anticuerpos anti-HMGCR.

#### 40 Ejemplo 9: Rasgos clínicos de pacientes anti-HMGCR-positivo

De los 45 pacientes anti-HMGCR-positivos, 30 (66,7%) habían tomado previamente estatinas (Tabla 1). Entre los 26 pacientes que acudieron a la clínica de los autores de la invención a la edad de 50 años o mayores, 24 habían tomado estatinas (92,3%). Por lo tanto, la prevalencia de uso de estatinas en pacientes con auto-anticuerpos anti-HMGCR es significativamente más alta que la que los autores de la invención y otros han reseñado anteriormente en pacientes emparejados en edad con otras miopatías (edades ~ 50 años), incluyendo DM (25%), PM (36,8%) e IBM (33,3%) (Grable-Esposito *et al.*, 2010 y Christopher-Stine *et al.*, 2010).

Pacientes Anti-HMGCR-positivos se caracterizaban por debilidad muscular proximal (95,6%), elevados niveles de CK (media  $\pm$  SD 9.718 + 7.383 UI/litro), y hallazgos miopáticos en EMG (97,3%) (Tabla 2). Se reseñó que todas las 40 muestras de biopsia muscular disponibles (100%) tenían que fibras degenerativas, regenerativas y/o necróticas prominentes. Se observaron infiltrados inflamatorios significativos en 8 de 40 muestras de biopsia muscular (20%) y se visualizaron vacuolas ribeteadas en 1 de 40 muestras de biopsia (2,5%); este paciente tenía predominantemente debilidad muscular proximal y no tenía características clínicas típicas de IBM. Los pacientes que no habían tomado estatinas eran clínicamente indistinguibles de los que las habían tomado, a excepción de su edad más joven (media  $\pm$  SD 37 + 17 años frente a 59  $\pm$  9 años), niveles de CK superiores (13.392  $\pm$  8.839 frente a 7.881  $\pm$  5.875 UI/litro) y raza (46,7% frente a 86,7% de blancos) (Tabla 5).

Tabla 5. Rasgos clínicos de los cuarenta y cinco pacientes auto-anticuerpos anti-HMG-CoA reductasa-positivos\*

5		Todos los pacientes		Pacientes no tratados con estatina		Pacientes expuestos a estatina		<i>P</i> <sup>‡</sup>
		nº (%) de pacientes <sup>†</sup>	Total nº evaluado	nº (%) de pacientes <sup>†</sup>	Total nº evaluado	nº (%) de pacientes <sup>†</sup>	Total nº evaluado	
10	Blanco	33 (73,3)	45	7 (46,7)	15	26 (86,7)	30	0,012
	Varones	19 (42,2)	45	5 (33,3)	15	14 (46,7)	30	NS
	Miopatía en EMG	36 (97,3)	37	12 (92,3)	13	24 (100 )	24	NS
	Irritable	27 (72,9)	37	9 (69,2)	13	18 (75)	24	NS
	No irritable	9 (24,3)	37	3 (23,1)	13	6 (25)	24	NS
15	Debilidad proximal	43 (95,6)	45	14 (93,3)	15	29 (96,7)	30	NS
	Necrosis tras biopsia	40 (100)	40	13 (100)	13	27 (100)	27	NS
	Inflamación en	8 (20)	40	5 (38,5)	13	3 (11,1)	27	0,11
20	Edad (años)	52 ± 16	45	37 ± 17	14	59 ± 9	30	<0,0001
	Niveles de Creatina quinasa	9.718 ± 7.383	45	13.392 ± 8.839	15	7.881 ± 5.875	30	0,0164

\* NS = no significativo; EMG = electromiografía. † edad y niveles de creatina quinasa se reseñan como la media ± desviación estándar. ‡ pacientes expuestos a estatinas frente a pacientes no tratados con estatinas.

25 Mientras que 43 de 45 pacientes anti-HMGCR-positivos no tenían otra enfermedad autoinmune sistémica (95,6%), el paciente 8196 tenía anticuerpos Jo-1 y enfermedad pulmonar intersticial. Otro paciente (paciente 8038) tenía escleroderma, anticuerpo anti-PM-Scl y enfermedad pulmonar intersticial. Ninguno de estos pacientes había tomado estatinas antes de desarrollar síntomas musculares.

30 La gran mayoría de los pacientes anti-HMGCR-positivos tenía características clínicas consistentes con una miopatía inmunomediada. Sin embargo, un solo paciente (paciente 8144) presentaba sólo mialgias persistentes después del uso de estatinas, la resistencia muscular subjetiva y objetiva normal hallazgos ordinarios en la MRI de los dos muslos, hallazgos normales en la EMG y un nivel de CK de tan sólo 254 UI/litro. El resultado del ELISA HMGCR del paciente eran menos de 3 desviaciones estándares por encima de la media de 2000 controles normales. Por lo tanto, su paciente debe ser vigilado en cuanto a signos de debilidad muscular y/o desarrollo de auto-anticuerpos HMGCR.

35 Ejemplo 10: Ninguna prevalencia incrementada del polimorfismo de un solo nucleótido asociada con miopatía con estatinas en pacientes anti-HMGCR-positivos

40 Un estudio reciente publicado por el Colectivo del Study of the Effectiveness of Additional Reductions in Cholesterol and Homocysteine (SEARCH) (*N Engl J Med* 2008; 359:789-99), ha demostrado que la presencia de un polimorfismo específico en el gen SLCO1B1 (es decir, el alelo rs4149056 C) está fuertemente asociado con el desarrollo de miopatía con estatinas. Este gen codifica el polipéptido transportador de aniones orgánicos de OATP-1B1, que regula la captación hepática de estatinas. Si bien la prevalencia del alelo C en su población de ~ 12.000 participantes (en su mayoría de ascendencia europea) era de 0,15, su prevalencia en los que desarrolló una miopatía con estatinas en el espacio de 1 año de comenzar con simvastatina a una dosis de 80 mg/día fue 0,54.

45 Muestras de ADN estaban disponibles de 17 de los pacientes anti-HMGCR-positivos, y la frecuencia del alelo rs4149056 C en esta población era 0,12. Cuando se excluyeron los 6 pacientes que no habían tomado estatinas y/o que eran de ascendencia no europea, la prevalencia del alelo C en los 11 pacientes restantes era de 0,14. Aunque el número de sujetos genotipados era pequeño, la prevalencia del alelo rs4149056 C en estos pacientes anti-HMGCR-positivos es consistente con el intervalo de 0,14-0,22 previamente reseñado entre los de ascendencia europea (Grupo de Colaboración SEARCH, *N Engl J Med* 2008; 359:789-99).

50 Ejemplo 11: La expresión de la HMG-CoA reductasa está sobre-regulada en la regeneración de fibras musculares en pacientes auto-anticuerpos anti-HMG-CoA reductasa-positivos.

Para examinar directamente la expresión de HMG-CoA reductasa *in vivo*, secciones de biopsia muscular se tiñeron con un anticuerpo anti-HMG-CoA reductasa policlonal comercialmente disponible (Millipore, Billerica, MA). Debido a que otros auto-antígenos asociados a miositis se expresan en niveles altos en las células musculares con rasgos de regeneración (Casciola-Rosen *et al.*, *J Exp Med* 2005; 201:591-601 y Mammen *et al.*, *Arthritis Rheum* 2009; 60:3784-93), secciones de biopsia muscular fueron co-teñidas con un anticuerpo anti-NCAM (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). NCAM (siglas inglesas de Molécula de Adhesión Celular Neural), un marcador establecido de la regeneración muscular. En muestras de biopsias musculares que muestran rasgos normales, HMGCR (Figura 8E) y NCAM (Figura 8D) se expresaron en niveles relativamente bajos (véase también la Figura 8F). En contraposición, las fibras NCAM-positivas eran prominentes en muestras de biopsia muscular obtenidas de pacientes auto-anticuerpos anti-HMGCR-CoA reductasa-positivos (que no habían tomado estatinas durante meses o años). fibras NCAM-positivas eran prominentes (Figura 8A). Curiosamente, la mayoría de estas fibras NCAM-positivas también expresaron altos niveles de-HMGCR CoA reductasa (Figuras 8B-C). Estos hallazgos proporcionan una confirmación *in vivo* de que las fibras musculares regenerantes de pacientes anti-HMGCR-positivos expresan altos niveles de HMGCR.

Las estatinas son una clase ampliamente prescrita de medicamentos con efectos adversos conocidos sobre los músculos, por lo general leves. Nuevos auto-anticuerpos que reconocen proteínas de 200-kd y 100-kd asociadas con miopatía autoinmune y el uso de estatinas se describieron anteriormente en esta memoria. Los resultados reseñados en esta memoria demuestran una relación causal plausible entre la exposición a estatinas y esta forma distinta de IMNM a través de la identificación del autoantígeno como HMGCR.

Ensayos de inmunoprecipitación demostraron la especificidad de los auto-anticuerpos para el extremo carboxi de esta enzima, mientras que los experimentos de competición confirmaron que los auto-anticuerpos anti-HMGCR inmunoprecipitaban tanto HMGCR como la proteína de 200-kd. La proteína mayor puede ser una proteína asociada o un multímero de HMGCR. Esta última posibilidad está sustentada por otros estudios que demuestran que HMGCR puede ser inmunoprecipitada como un monómero de 97-kd y como un dímero de 200-kd (Parker *et al.*, *J Biol Chem* 1989; 264:4877-87).

Habiendo identificado a HMGCR como el auto-antígeno relevante, se desarrolló un ELISA para rastrear rápidamente sueros de pacientes. Utilizando este ELISA, se encontró que la prevalencia de auto-anticuerpos anti-HMGCR era del 6% entre los pacientes con sospecha de miopatía que se presentaron al Johns Hopkins Myositis Center. Auto-anticuerpos anti-HMGCR se identificaron preferiblemente en pacientes con una miopatía necrotizante en la biopsia muscular y no se encontraron en pacientes con IBM, DM o controles normales. Por lo tanto, los auto-anticuerpos anti-HMGCR son uno de los auto-anticuerpos más frecuentes en la cohorte, sólo superados por anti-Jo-1. Dado que la miopatía necrotizante no siempre está inmunomediada, la detección de anti-HMGCR mediante ELISA es probable que sea diagnósticamente útil para la identificación de pacientes con esta forma de IMNM, la mayoría de los cuales responden a la terapia inmunosupresora.

Entre los 45 pacientes anti-HMGCR-positivos, uno tenía el síndrome de anti-sintetasa Jo-1-positivo (2,2%) y el otro tenía la escleroderma con auto-anticuerpos anti-PM-Scl (2,2%). Por lo tanto, al igual que con otras formas de enfermedad muscular autoinmune, los pacientes con auto-anticuerpos anti-HMGCR pueden tener, en raras ocasiones, un síndrome de solapamiento con otra enfermedad del tejido conjuntivo.

De manera importante, la expresión muscular de HMG-CoA reductasa se incrementa con la exposición a estatinas, así como en la regeneración de células musculares marcadas por la expresión de NCAM. Esto indica que el daño muscular inmunomediado iniciado en presencia de estatinas y asociado con auto-anticuerpos anti-HMG-CoA reductasa puede mantenerse, incluso después de suspender la estatina, a través de la expresión persistentemente incrementada de la HMG-CoA reductasa asociada con la reparación del músculo.

Dado que la mayoría de los pacientes que toman estatinas no desarrollan una miopatía inmunomediada, otros factores, incluyendo la predisposición genética, también deben desempeñar un papel. El factor genético más común que predispone a los pacientes a una miopatía con estatinas auto-limitada es la presencia del alelo rs4149056 C, que representa hasta el 60% de las miopatías con estatinas en pacientes que toman 80 mg de simvastatina al día (Grupo Colaborativo RESEARCH 2008). Lo más probablemente, este polimorfismo aumenta el riesgo de miopatía por la disminución de la captación hepática de las estatinas por el transportador de OATP-1B1. Sin embargo, esta alteración genética no estaba sobre-representada en pacientes auto-anticuerpos anti-HMG-CoA reductasa-positivos, lo que sugiere que se requieren otras susceptibilidades genéticas o co-exposiciones medioambientales para el desarrollo de la respuesta autoinmune.

Curiosamente, treinta y tres por ciento de los pacientes auto-anticuerpos anti-HMG-CoA reductasa-positivos no había tomado previamente estatinas. Aunque estos pacientes eran más jóvenes en el momento del brote de la enfermedad y tenían niveles más altos de creatina quinasa, también tenían una miopatía aparentemente

inmunomediada y no se podían distinguir de aquellos con exposición a estatina. Es probable que otros factores genéticos y/o medioambientales puedan provocar niveles elevados de expresión de HMG-CoA reductasa en estos pacientes.

5 Debido a que los pacientes de la clínica descritos en esta memoria presentaban debilidad y otros rasgos destacados de miopatía, este estudio no aborda cómo auto-anticuerpos anti-HMGCR prevalentes se encuentran entre los pacientes que toman estatinas que tienen síntomas más leves. Sin embargo, ningún paciente anti-HMGCR-positivo fue identificado con mialgias persistentes inducidas por estatinas que no tenían otra evidencia clínica convincente de miopatía. Esto indica que una respuesta auto-inmune también puede estar asociada con síntomas miopáticos de bajo grado en algunos pacientes.

10 Los resultados presentados arriba en esta memoria en los Ejemplos 1-4 se obtuvieron utilizando los siguientes materiales y métodos.

#### Pacientes

15 Doscientos veinticinco pacientes con sueros de bancos, biopsias musculares disponibles para su revisión y una miopatía según se define por debilidad muscular proximal, elevados niveles de creatina quinasa (CK), hallazgos en electromiografía miopática (EMG), edema muscular en formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) y/o rasgos de miopatía en la biopsia muscular fueron inscritos en un estudio longitudinal, aprobado por la Junta de Revisión Institucional de Johns Hopkins, de marzo de 2007 a diciembre de 2008. Además de proporcionar un historial y de someterse a un examen físico en el Johns Hopkins Myositis Center, estos pacientes fueron sometidos a una evaluación integral que incluía algunos o todos de los siguientes: (1) electromiografía y estudios de conducción nerviosa, (2) MRI bilateral del muslo sin contraste, (3) ensayos de función pulmonar, (4) rastreo de tumores malignos incluyendo tomografía computarizada del tórax, abdomen y pelvis, (5) una evaluación estándar de laboratorio realizada por varios laboratorios comerciales diferentes, incluyendo los niveles de CK, rastreo de anticuerpos antinucleares (ANA), tasa de sedimentación de eritrocitos (ESR), niveles de proteína C-reactiva (PCR), rastreo anti-Ro/La, y rastreo de auto-anticuerpos específicos para la miositis (MSA), y (6) cuando se sospecha con base en los rasgos clínicos o biopsias, pruebas para la enfermedad muscular hereditaria incluyendo distrofias musculares de cinturas (por el panel de Evaluación de Distrofia Muscular de Cinturas: Athena Diagnostics, Worcester, MA), deficiencia de maltasa ácida (mediante el Perfil de Miopatía mediante Almacenamiento de Glucógeno 'A': Athena Diagnostics y/o ensayo de la mancha de sangre seca para la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa: Genzyme, Cambridge, MA) y/o la distrofia facioescapulohumeral (mediante el test de ADN por distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD): Athena Diagnostics).

35 Con el fin de determinar si se utilizaron las estatinas a una mayor frecuencia en pacientes con el auto-anticuerpo anti-200/100-kD, se determinó la frecuencia de uso de estatinas para los pacientes en la cohorte que padecían polimiositis definitiva o probable (PM) o dermatomiositis (DM) (Bohan y Peter, *N Engl J Med* 1975; 292:344-7 y 292:403-7), así como en aquellos con posible miositis por cuerpos de inclusión (IBM) (Griggs RC, *et al.*, *Ann Neurol* 1995; 38:705-13). Las edades de los pacientes se compararon utilizando tests *t* de Student de 2 colas. Se utilizó la prueba de chi-cuadrado para comparar la frecuencia del uso de estatinas en los diferentes grupos.

#### Análisis de la biopsia muscular.

40 Muestras de biopsias musculares se obtuvieron de los grupos de músculos deltoides, bíceps o cuádriceps. En cada caso, se determinó que el músculo seleccionado era débil por el médico examinador. Los cortes de muestras de biopsias musculares fueron evaluados en el Johns Hopkins Neuromuscular Pathology Laboratory. Estos estudios incluyeron hematoxilina y tejido teñido con eosina, así como algunas o todas de las siguientes manchas: tricromo de Gomori modificado, adenosina trifosfatasa a pH 4,3, pH 4,6 y pH 9,4, NAD tetrazolio reductasa, fosfatasa ácida, deshidrogenasa succínica, citocromo oxidasa, esterasa, fosfatasa alcalina, ácido peryódico de Schiff (PAS), control de PAS-diasatasa y rojo Congo. Muestras tanto congeladas como embebidas en parafina fueron examinadas rutinariamente en cuanto a la presencia de fibras degenerantes, regenerantes y/o necróticas, inflamación endomisial primaria, inflamación perivascular, vacuolas ribeteadas, atrofia perifascicular y fibrosis. Los autores de la invención identificaron muestras de biopsias de "miopatía necrotizante" en base a la presencia de fibras musculares necróticas como la característica histológica anormal predominante; con la excepción de miofibras necróticas sometidas a miofagocitosis, las células inflamatorias eran escasas, si estaban en todo caso presentes. Muestras de biopsias musculares de pacientes con la especificidad de auto-anticuerpos anti-200/100-kD se tiñeron con anticuerpos que reconocen CD31 (un marcador de células endoteliales), C5b-9 (es decir, el complejo de ataque a la membrana) y el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I.

En pocas palabras, secciones de biopsias musculares de 7  $\mu$  de espesor congeladas se fijaron en acetona enfriada con hielo. Después de diez minutos en reactivo de bloqueo de peroxidasa (Dako, Carpintería, CA) a temperatura ambiente, las secciones se incubaron con albúmina de suero bovino/solución salina tamponada con fosfato (BSA/PBS) al 5% durante una hora a 37°C. Anticuerpos primarios se prepararon en BSA/PBS al 1% a las siguientes diluciones: 1:50 para MHC de clase I (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), 1:20 para CD31 (Dako), 1:50 para Cb5-9 (Santa Cruz Biotechnology); incubaciones primarias se realizaron durante la noche a 4°C. Después de lavados con PBS, los cortes se incubaron con anticuerpo secundario anti-ratón de cabra marcado con peroxidasa de rábano picante (Dako) en BSA/PBS al 1% a razón de 1:500 durante una hora a temperatura ambiente. El compuesto 3,3'-diaminobencidina cromógeno (Dako) se utilizó para visualizar cada uno de los anticuerpos, y todas las secciones se contra-tiñeron con hematoxilina. Muestras de tejido muscular normal se utilizaron como controles negativos, y tejido muscular de un paciente Jo-1-positivo con miositis se utilizó como control positivo para la tinción de MHC de clase I. Para cada uno de los anticuerpos primarios, todas las secciones de los músculos se procesaron simultáneamente en las mismas condiciones.

#### Inmunoprecipitaciones

Muestras de suero recogidas de cada uno de los pacientes fueron almacenadas a -80°C. Células HeLa cultivadas fueron radiomarcadas durante dos horas con 100  $\mu$ Ci/ml de <sup>35</sup>S-metionina y cisteína (MP Biomedicals, Solon, OH) en medio libre de metionina y libre de cisteína. Las células se lisaron subsiguientemente en tampón A (Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Nonidet P40 al 0,5%, desoxicolato de sodio al 0,5%, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,1% y un cóctel inhibidor de proteasas). Cada una de las placas de 10 cm se lisó en 1 ml de tampón A y se utilizó durante 10 inmunoprecipitaciones. Las inmunoprecipitaciones se realizaron mediante la adición de 1  $\mu$ l de sueros de pacientes a 100  $\mu$ l de lisado radiomarcado y llevando el volumen a 1 ml con tampón B (Nonidet P40 al 1%, Tris 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM y un cóctel inhibidor de proteasas) y haciendo rotar la mezcla durante una hora a 4°C. Perlas de agarosa de proteína A (Pierce, Rockford, IL) se utilizaron para precipitar los complejos anticuerpo-antígeno que subsiguientemente se sometieron a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10%. Los inmunoprecipitados radiomarcados se visualizaron mediante fluorografía.

Los resultados reseñados en esta memoria en los Ejemplos 5-11 anteriores se obtuvieron utilizando los siguientes materiales y métodos.

#### Pacientes y genotipado

Entre mayo de 2002 y abril de 2010, 750 pacientes de los que se sospechaba una miopatía, según se definía por debilidad muscular proximal, elevados niveles de creatina quinasa (CK), hallazgos miopáticos en electromiografía (EMG), edema muscular en formación de imágenes de resonancia magnética (MRI) y/o rasgos miopáticos en la biopsia muscular, se inscribieron en un estudio longitudinal. Los pacientes se definieron como que tienen polimiositis (PM) o dermatomiositis (DM) si padecían una enfermedad probable o definitiva de acuerdo con los criterios de Bohan y Peter (Bohan y Peter, *N Engl J Med* 1975; 292: 344-7 y 403-7) y que padecían miositis por cuerpos de inclusión (IBM) si cumplían los criterios de Griggs *et al.* para una posible enfermedad (Griggs *et al.*, *Ann Neurol* 1995; 38:705-13). Suero estaba disponible de cada uno de los sujetos y muestras de ADN estaban disponibles de 260 sujetos. También se obtuvieron muestras de suero de veinte sujetos de control sanos sin exposición previa a estatinas. Todos los sujetos fueron enrolados en los protocolos aprobados por la Junta de Revisión Institucional de Johns Hopkins. El genotipado del alelo rs4149056 C se efectuó utilizando el Ensayo de Genotipado del Metabolismo de Fármacos TaqMan® verificado apropiado (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) en todos los diecisiete pacientes anti-HMG-CoA reductasa-positivos para quienes las muestras de ADN estaban disponibles (véase la Tabla 4 para obtener información clínica detallada).

#### Inmunoprecipitaciones de lisados de células radiomarcadas.

Células HeLa se cultivaron en ausencia o presencia de mevinolina 10  $\mu$ M (Sigma, St. Louis, MO) durante 22 horas y luego se radiomarcaron con 100  $\mu$ Ci/ml de <sup>35</sup>S-metionina/cisteína (MP Biomedicals, Solon, OH), se lisaron y se inmunoprecipitaron con sueros de pacientes (Véanse los Ejemplos 1-4, arriba). Inmunoprecipitados se redujeron, hirvieron, sometieron a electroforesis geles de dodecil-sulfato de sodio-poliacrilamida, y se visualizaron mediante fluorografía.

#### Inmunoprecipitaciones utilizando proteínas transcritas/traducidas *in vitro* (IVTT) marcadas con <sup>35</sup>S-metionina

ADN que codifica HMG-CoA reductasa humana de longitud completa se adquirió de Invitrogen (Carlsbad, CA). ADN que codifica el fragmento N-terminal (aminoácidos (aa) 1-377) se generó mutando R377 a un codón de parada. ADN

5 que codifica el extremo C de HMG-CoA reductasa (aa 340-888) se preparó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el ADN de longitud completa como un molde. Las construcciones se verificaron en cuanto a la secuencia y se utilizaron en reacciones de IVTT (Promega, Madison, WI), generando proteínas marcadas con <sup>35</sup>S-metionina. Se realizaron inmunoprecipitaciones utilizando estos productos, con la detección de los inmunoprecipitados tal como se describe arriba.

#### Experimentos de competición

10 Un microlitro de cada uno de los sueros de pacientes se preincubó (30 minutos a 4°C en 50 µl) con el dominio catalítico de HMG-CoA reductasa humana (aa 426-888) expresada como una proteína de fusión con glutatión S transferasa (a la que se alude en lo sucesivo como "HMG-CoA reductasa C-terminal"; Sigma). Anticuerpos preincubados se utilizaron subsiguientemente para inmunoprecipitaciones con HMG-CoA reductasa de IVTT de longitud completa o lisados radiomarcados hechas a partir de células HeLa tratadas con mevinolina.

#### ELISA anti-HMGCR.

15 Placas de ELISA (96 pocillos) se recubrieron durante la noche a 4°C con 100 ng de HMG-CoA reductasa C-terminal (Sigma) diluida en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Pocillos de réplica se incubaron con PBS solo. Después de lavar las placas, las muestras de suero humano diluidas a razón de 1:400 en PBS con Tween-20 al 0,05% se añadieron a los pocillos durante una hora a 37°C. Después del lavado, anticuerpo anti-humano de cabra marcado con peroxidasa de rábano picante (1:10.000; Pierce, Rockford, IL) se añadió a cada uno de los pocillos durante 30 minutos a 37°C. El desarrollo de color se realizó utilizando reactivo de peroxidasa SureBlue™ (KPL, Gaithersburg, MD) y se determinó la absorbancia a 450 nm. Para cada una de las muestras, la absorbancia de fondo de los pocillos recubiertos con PBS se restó de la del correspondiente pocillo recubierto con HMG-CoA reductasa C-terminal. La absorbancia de la muestra de ensayo se expresó como una proporción de la absorbancia en una muestra de control positivo arbitrario (muestra 9176), un suero de referencia incluido en cada ELISA.

#### Inmunohistoquímica

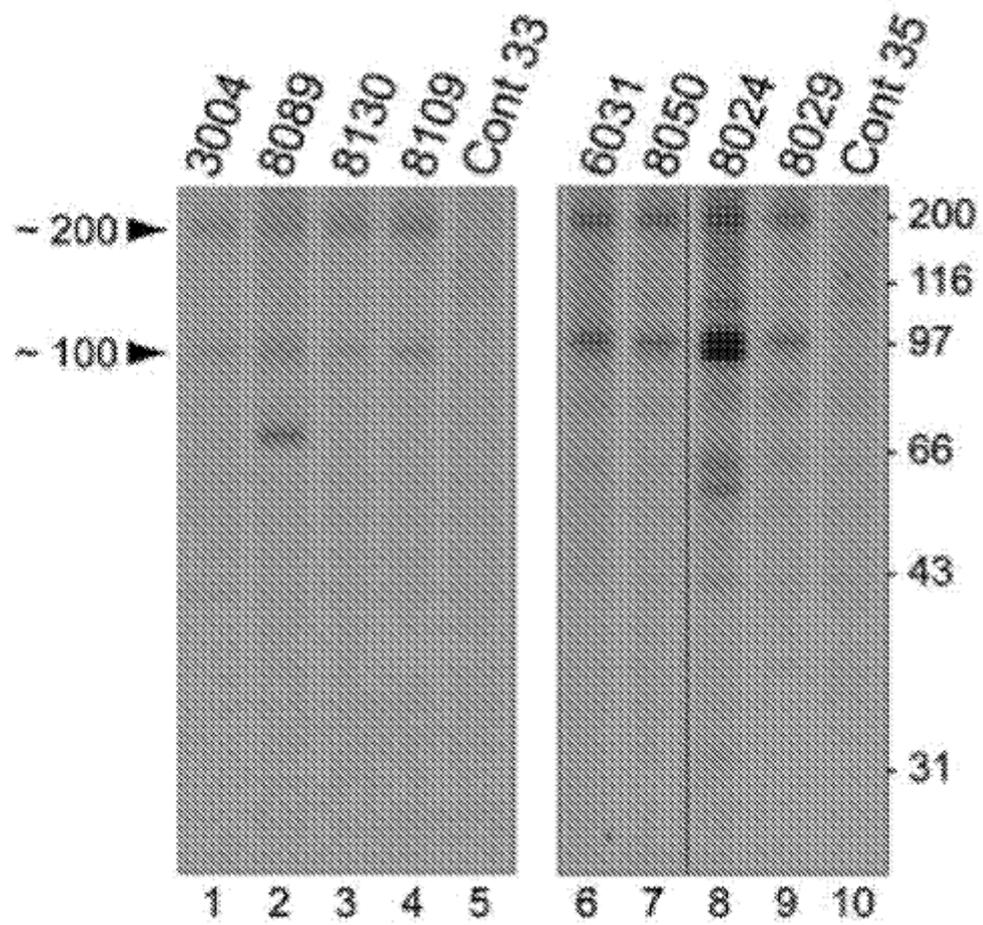
25 La recogida y el uso de muestras de biopsia humanas fueron aprobados por la Junta de Revisión Institucional de Johns Hopkins. Se estudiaron muestras de biopsia musculares de 6 pacientes con anticuerpos anti-HMGCR y 3 sujetos control normales. Todas las muestras de biopsias se obtuvieron de pacientes que no habían tomado estatinas durante más de tres meses. La tinción de secciones de parafina se realizó como se ha descrito previamente (9). Incubaciones de anticuerpos comprendían mezclas de anticuerpos primarios anti-HMGCR de conejo (Millipore) y moléculas de adhesión de células anti-neurales de ratón (anti-NCAM; Santa Cruz Biotechnology),  
30 seguido de anticuerpos secundarios de IgG anti-conejo de burro Alexa Fluor 594 (para detectar HMGCR) e IgG anti-ratón de burro Alexa Fluor 488 (para detectar NCAM) (Invitrogen).

**REIVINDICACIONES**

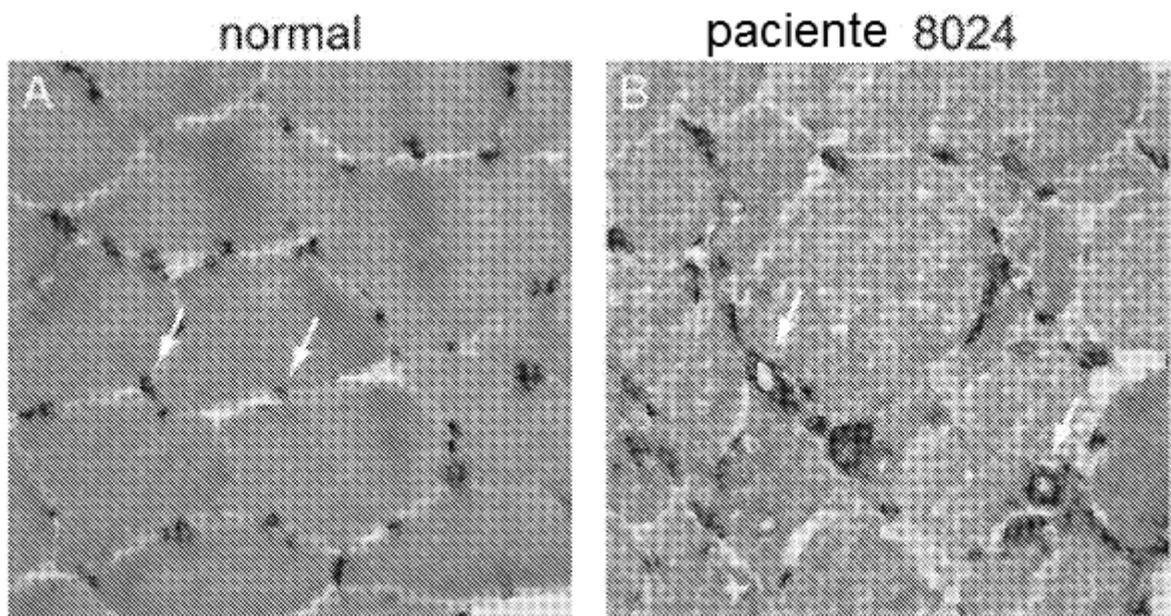
- 5 1. Un método in vitro para diagnosticar una miopatía necrotizante auto-inmunomediada en un sujeto mamífero, determinando la presencia de auto-anticuerpos específicos para la proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR) o un fragmento de la misma que tiene actividad de unión a auto-anticuerpos anti-HMGCR en el sujeto, que comprende las etapas de:
- 10 a) realizar un inmunoensayo poniendo en contacto una muestra biológica obtenida del sujeto con una proteína HMGCR o un fragmento de la misma que tiene actividad de unión a auto-anticuerpos anti-HMGCR, b) detectar la presencia de auto-anticuerpos en la muestra que específicamente unen la proteína HMGCR o el fragmento de la misma que tiene actividad de unión a auto-anticuerpos anti-HMGCR, en donde la presencia de auto-anticuerpos que específicamente unen la proteína HMGCR o el fragmento de la misma que tiene actividad de unión a auto-anticuerpos anti-HMGCR es indicativa que el sujeto padece miopatía.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es suero, sangre, plasma o saliva.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el inmunoensayo se selecciona del grupo que consiste en: análisis con enzima unida a inmosorbente (ELISA), inmunoprecipitación, ensayo de inmosorbente fluorescente (FIA), ensayo de inmosorbente ligado a compuesto químico (CLIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunotransferencia, ensayo inmunométrico, citometría de flujo, transferencia western e inmunohistoquímica.
- 15 4. El método in vitro de la reivindicación 1, en el que el fragmento de proteína HMGCR que tiene actividad de unión a auto-anticuerpos anti-HMGCR es un fragmento C-terminal que comprende los aminoácidos 340-888 de la proteína HMGCR.

20

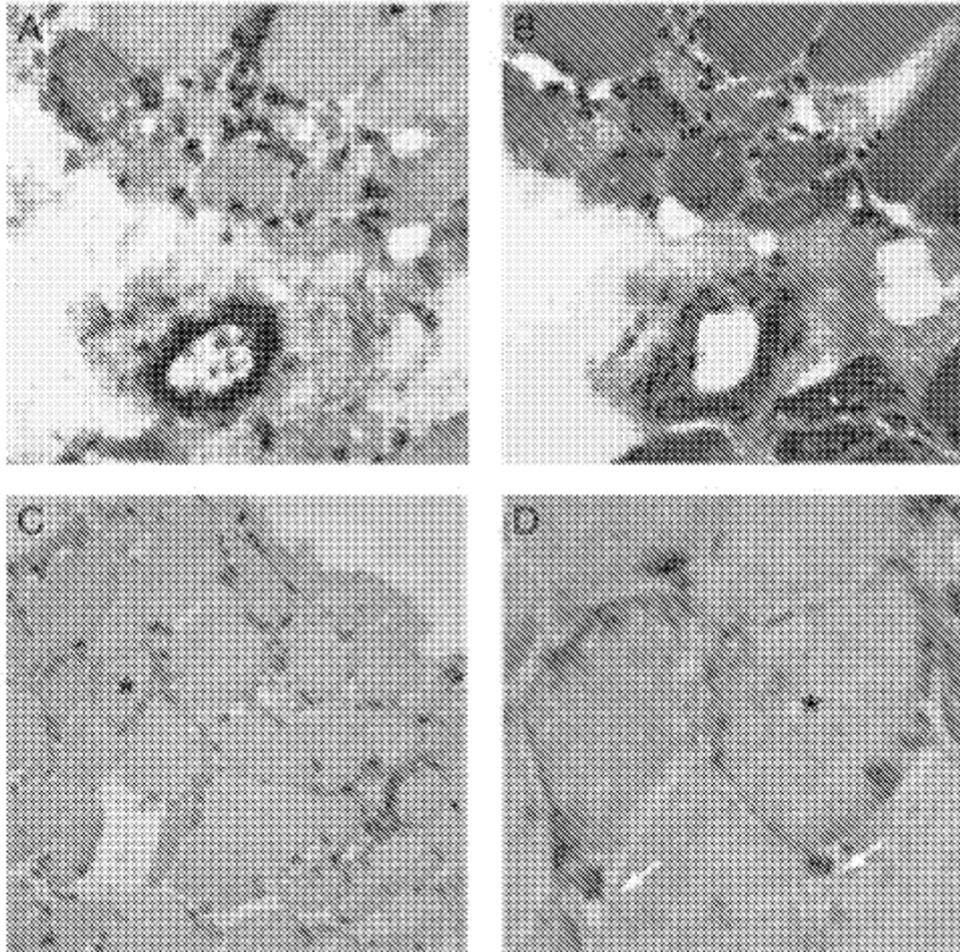
Figura 1



**Figura 2**



**Figura 3**



**Figura 4**

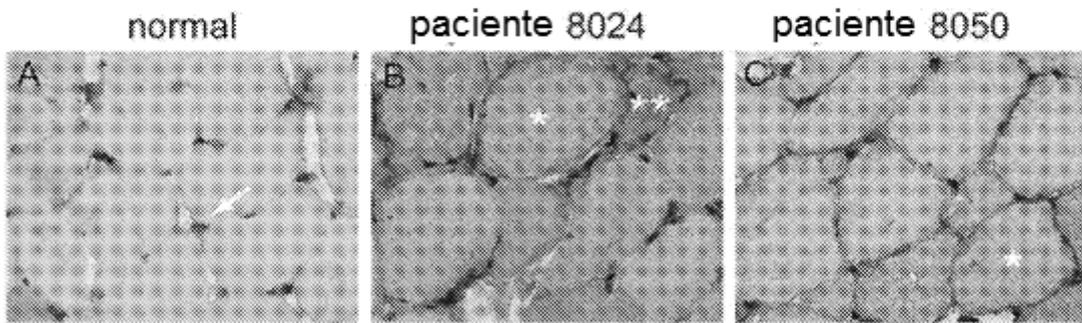


Figura 5

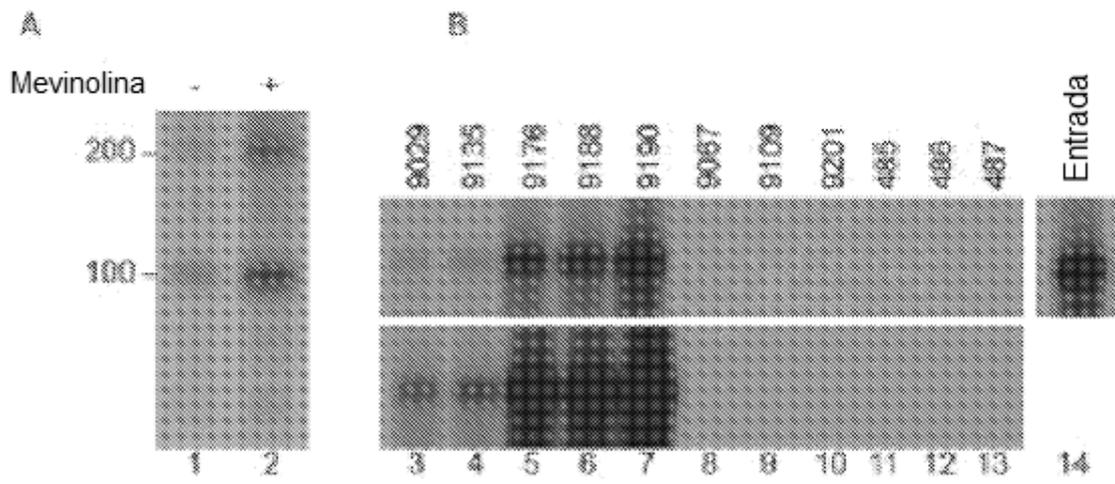


Figura 6

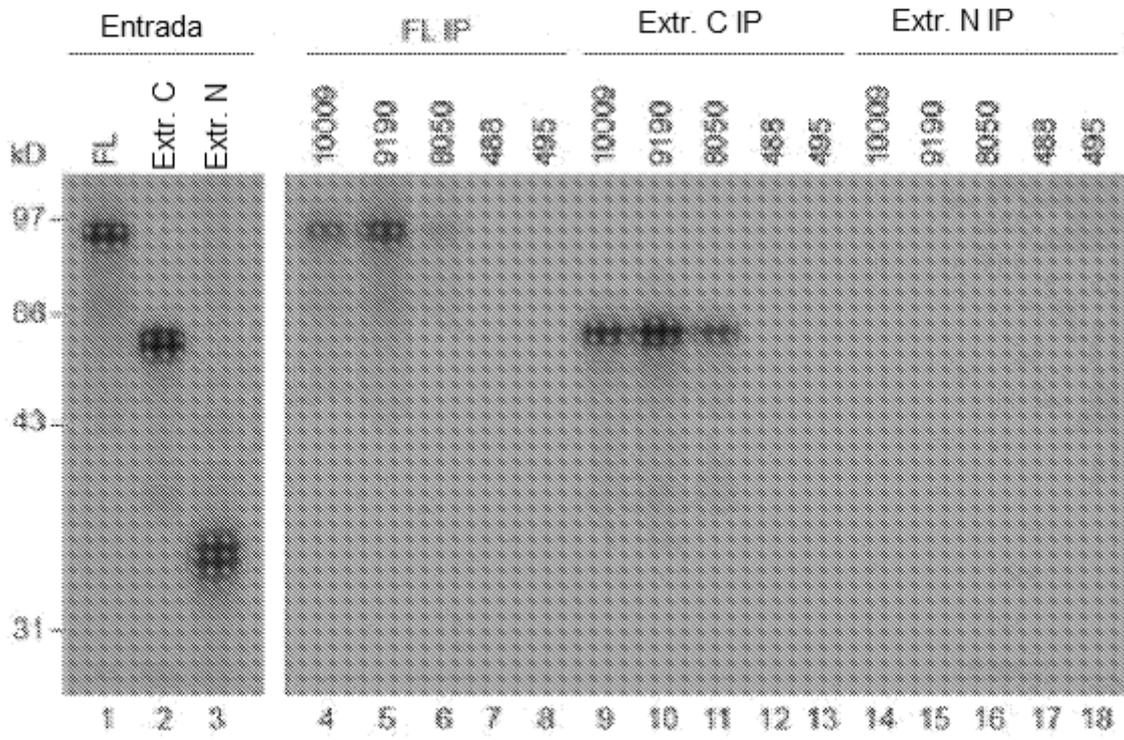
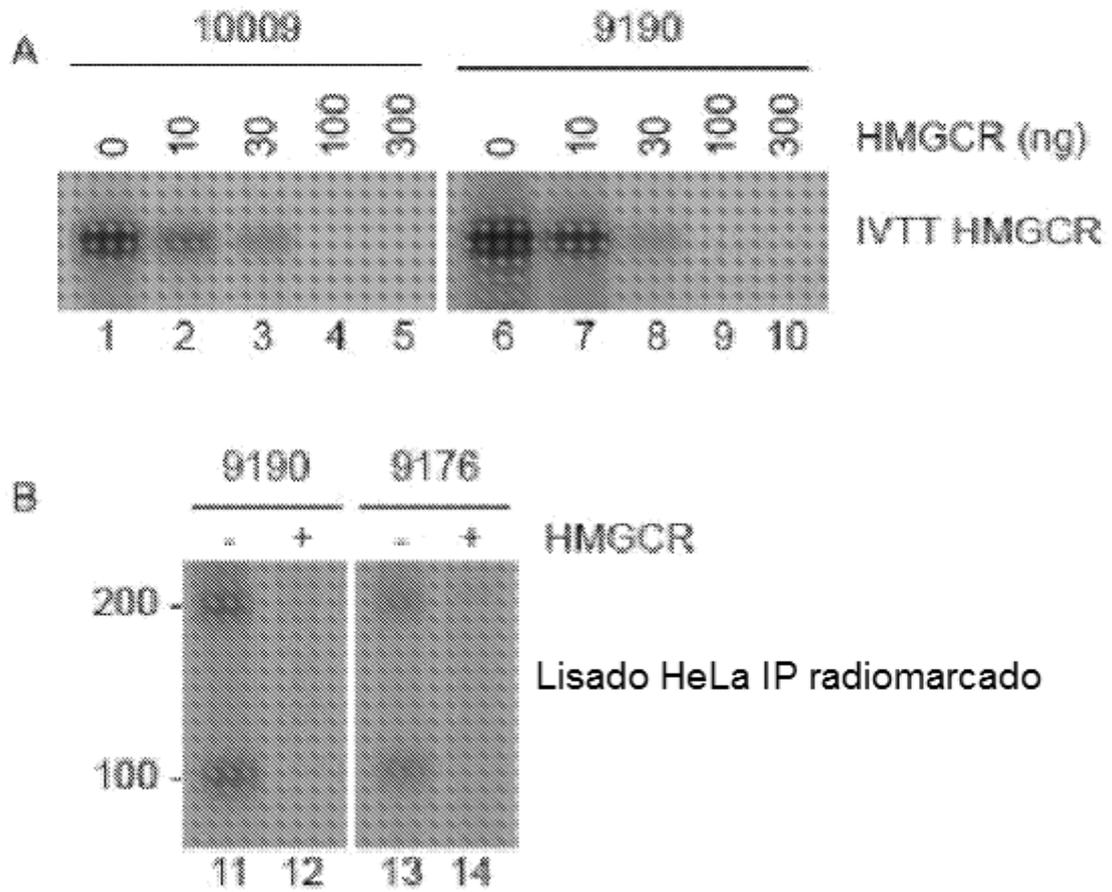


Figura 7



**Figura 8**

