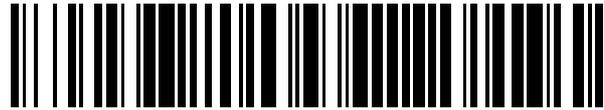


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 987**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2011 E 11781733 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2015 EP 2606356**

54 Título: **Métodos y medios para diagnosticar espondiloartritis usando marcadores de autoanticuerpos**

30 Prioridad:

16.08.2010 EP 10172861

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

09.03.2016

73 Titular/es:

**MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER
(100.0%)**

**Carl-Neuberg-Strasse 1
30625 Hannover, DE**

72 Inventor/es:

**BAERLECKEN, NIKLAS THOMAS y
WITTE, TORSTEN**

74 Agente/Representante:

LOZANO GANDIA, José

ES 2 562 987 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).

MÉTODOS Y MEDIOS PARA DIAGNOSTICAR ESPONDILOARTRITIS USANDO MARCADORES DE AUTOANTICUERPOS

DESCRIPCIÓN

- 5 **Campo de la invención**
- 10 La presente invención se refiere en general a métodos para diagnosticar la presencia de o el riesgo de desarrollar, o al control terapéutico de, espondiloartritis (Spa), en particular, de la espondilitis anquilosante (AS) en un sujeto, en particular en mamíferos. Además, la presente invención se refiere a kits de prueba para su uso en el diagnóstico de la presencia de o el riesgo de desarrollar, o para el control terapéutico de, Spa, como AS, en un sujeto. En particular, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar la presencia de o el riesgo de desarrollar, o para el control terapéutico de, Spa, como AS, en un sujeto analizando la presencia de autoanticuerpos frente a CD74 y/o IKBKB en un sujeto. La presencia de autoanticuerpos frente a CD74 y/o IKBKB es indicativa de la presencia de o el riesgo de desarrollar, o para el control terapéutico de, Spa, como AS. En particular, la detección de la presencia de autoanticuerpos frente a CD74 y/o IKBKB permite un diagnóstico precoz de Spa, en particular, AS.
- 15
- Antecedentes de la invención**
- 20 La espondiloartritis (Spa) también conocida como espondiloartropatía o espondilitis identifica un grupo de enfermedades que afectan principalmente a la columna vertebral (espondilo-) y otras articulaciones. Este grupo de enfermedades también se identifica como espondiloartritis seronegativa. El término "seronegativa" se refiere al hecho de que habitualmente no están presentes factores reumatoides en la sangre. El grupo de Spa puede dividirse en espondilitis anquilosante (AS), artritis reactiva y su manifestación especial, síndrome de Reiter, y en artritis psoriásica (PsA), artritis enteropática y espondiloartritis indiferenciada. Varias de estas enfermedades también pueden manifestarse sólo como artritis periférica sin inflamación del esqueleto axial. En vista del hecho de que este grupo de enfermedades es una enfermedad seronegativa, el diagnóstico precoz es difícil tal como se detalla a continuación.
- 25
- 30 La espondilitis anquilosante (AS) también conocida como enfermedad de Bechterew es una enfermedad reumatoide inflamatoria común, que afecta principalmente al esqueleto axial y está asociada con sacroilítis, uveítis y entesitis. Afecta a más del 0,1% de la población y puede estar asociada con uveítis, fibrosis pulmonar apical y enfermedad cardíaca. La AS es un miembro del grupo de las espondiloartropatías seronegativas. Se cree que hay predisposición genética. Adicionalmente, en la literatura se describe que la AS es una enfermedad autoinmunitaria. Normalmente se ven afectadas las articulaciones en la columna vertebral y la articulación sacroilíaca en la pelvis. Finalmente, puede producirse una fusión de la columna vertebral. La etiología de la AS se desconoce, pero se cree que está mediada de manera inmunitaria. Por ejemplo, se describen fenómenos autoinmunitarios frente al proteoglicano agrecano. Normalmente, los primeros síntomas de la enfermedad aparecen entre los 20 y los 25 años de edad. Los pacientes sin tratamiento habitualmente padecen rigidez matutina en la parte inferior de la columna vertebral o en ocasiones en toda la columna vertebral, a menudo con dolor referido en una u otra nalga o la parte trasera del muslo procedente de la articulación sacroilíaca. Los hombres se ven más afectados que las mujeres. De manera interesante, la AS está asociada con una inflamación del ojo (iridociclítis y uveítis) en aproximadamente el 40% de los casos.
- 35
- 40
- 45 En el transcurso de la enfermedad, la columna vertebral se vuelve porosa, lo que finalmente conduce a la rotura de las vértebras. Se asume que aproximadamente el 1,75% de los adultos tienen prevalencia de desarrollar AS y espondiloartritis indiferenciada.
- 50 El diagnóstico de Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada, representa una tarea desafiante para el diagnóstico de laboratorio. Es bastante común, para el diagnóstico de Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada, que no se detecte o se retarde notablemente, particularmente, en el entorno de atención primaria. Por ejemplo, en promedio, hay un retardo de 7-10 años en el diagnóstico de AS desde la aparición de los síntomas. El motivo de este retardo es el hecho de que no hay ninguna prueba directa para diagnosticar Spa, como AS. Por tanto, la Spa, como AS, espondiloartritis indiferenciada o PsA, debe diagnosticarse mediante un diagnóstico diferencial excluyendo otra enfermedad con síntomas similares, como osteoartritis, osteoporosis, hernia de disco o infecciones bacterianas. Hoy en día, el examen clínico en estudios de rayos X de la columna vertebral que muestran cambios característicos de la columna vertebral y sacroilítis es la principal herramienta de diagnóstico. Sin embargo, los estudios de rayos X conducen a un retardo prolongado en el diagnóstico, dado que los cambios evidentes utilizando rayos X sólo se producen varios años tras la aparición de la enfermedad. Aunque la formación de imágenes mediante resonancia magnética puede permitir establecer un diagnóstico precoz, el diagnóstico mediante resonancia magnética es caro y además no todos los pacientes que tengan dolor se diagnosticarían mediante espectrometría de resonancia magnética.
- 55
- 60
- 65 Aunque existe la necesidad de marcadores de diagnóstico de Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada, en particular de marcadores que permitan un diagnóstico precoz de dichas enfermedades, aún no se ha establecido ningún marcador específico. En la técnica se han descrito varios posibles marcadores de diagnóstico. Por ejemplo,

las variaciones del gen HLA-B aumentan el riesgo de desarrollar AS, aunque no es una prueba de diagnóstico. Se ha descrito que sujetos con la variante HLA-B27 corren un riesgo mayor que la población general de desarrollar el trastorno. El hecho de que los sujetos sean positivos para HLA-B27 también es indicativo de otros tipos de enfermedades, como enfermedad de Reiter así como artritis psoriásica, pero también de artritis reumatoide seropositiva. Incluso el 10% de los individuos sanos porta el antígeno HLA-B27. Por tanto, puede producirse un diagnóstico de falso positivo y la especificidad de HLA-B27 para Spa, en particular, para AS y espondiloartritis indiferenciada, es baja.

Recientemente, se han descrito anticuerpos anti-agalactosil-IgG en AS y artritis psoriásica (PsA), Chou, C.-L., *et al.*, Clin Rheumatol, 2010, DOI 10.1007/s10067-010-1413-7. Sin embargo, el anticuerpo anti-agalactosil-IgG descrito en ese documento también se ha descrito como un marcador serológico útil para la artritis reumatoide. Además, en la espondiloartropatía seronegativa, de la que son representativas AS y PsA, también se han detectado anticuerpos anti-agalactosil-IgG. Por tanto, el anticuerpo anti-agalactosil-IgG no permite discriminar entre AS y PsA y entre AS y otros trastornos reumáticos inflamatorios.

Además, el documento WO 2010/037184 describe marcadores de diagnóstico para AS. En ese documento se describen métodos de diagnóstico y agentes para diagnosticar la presencia o el riesgo de desarrollar AS en mamíferos. Dichos métodos de diagnóstico y agentes se basan en la detección de polimorfismos dentro de diversos genes. Los marcadores de diagnóstico y la prueba de diagnóstico descritos en ese documento se basan en la detección de moléculas de ácido nucleico o la detección de proteínas de los respectivos genes y proteínas.

Muy recientemente, el examen y la evaluación del péptido de simulación como biomarcador sérico útil de AS usando la técnica de presentación en fago se han descrito por Wang, M., *et al.*, Rheumatol Int, DOI 10.1007/s00296-010-1403-8. En ese documento, los autores dan a conocer una secuencia peptídica denominada AS1 que debe representar un péptido útil que reacciona con sueros de pacientes con AS y, por tanto, puede ser un candidato para un biomarcador sérico específico. En ese documento se identifica que el péptido corto no tiene ninguna similitud significativa con otras secuencias. Wright, C., *et al.*, 2010, Mol Cell Proteomics, DOI 10.1074, mcp 11900384-MCP200, muestra la detección de múltiples autoanticuerpos en pacientes con AS usando ensayos de proteínas programables con ácido nucleico.

En vista de lo anterior, existe la necesidad actual de proporcionar una herramienta y un método de diagnóstico que permitan diagnosticar y evaluar el riesgo de desarrollar Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada, así como una herramienta y un método para el control terapéutico de Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada. Además, esta herramienta, por ejemplo un kit, o método debe permitir preferiblemente diferenciar entre diferentes espondiloartropatías seronegativas. En particular, el marcador de diagnóstico puede permitir diferenciar entre AS y PsA y entre AS y otros trastornos reumáticos inflamatorios.

Breve descripción de la presente invención

Los presentes inventores se propusieron proporcionar un método de diagnóstico para determinar la presencia de o el riesgo de desarrollar Spa, como AS, así como para el control terapéutico de Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada, en un sujeto. Es decir, los presentes inventores reconocieron que los sujetos que padecen Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada, tienen autoanticuerpos dirigidos contra la molécula CD74 y/o la molécula IKBKB. Por tanto, es posible un diagnóstico precoz de Spa, en particular AS y espondiloartritis indiferenciada, incluso antes de tener evidencias por rayos X.

Por tanto, una primera realización de la presente invención se refiere a un método para diagnosticar la presencia de o el riesgo de desarrollar, o para el control terapéutico de, espondiloartritis (Spa), en particular de espondilitis anquilosante (AS) y espondiloartritis indiferenciada, en un sujeto que comprende

a. obtener del sujeto una muestra biológica, y

b. analizar la muestra para determinar la presencia de autoanticuerpos frente a CD74 y/o IKBKB,

según lo cual la presencia de autoanticuerpos frente a CD74 y/o IKBKB es indicativa de la presencia de o el riesgo de desarrollar, o para el control terapéutico de, Spa, en particular, AS y espondiloartritis indiferenciada.

Preferiblemente, se determina la presencia de autoanticuerpos frente a tanto CD74 como IKBKB.

Preferiblemente, dicha detección de autoanticuerpos se lleva a cabo usando inmunoensayos, como ELISA. Normalmente, la muestra biológica que va a someterse a prueba se obtiene de sangre, en particular, suero.

Se prefiere que el método según la presente invención permita discriminar entre AS y PsA. Por tanto, el método de diagnóstico según la presente invención representa el primer método que permite un diagnóstico positivo de AS y espondiloartritis indiferenciada en un sujeto. El diagnóstico es posible en una fase temprana de la enfermedad.

Otra realización de la presente invención se refiere a un kit de prueba para su uso en un método según la presente invención, concretamente para diagnosticar la presencia de o el riesgo de desarrollar, así como para el control terapéutico de, Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada, en un sujeto que comprende medios para determinar autoanticuerpos frente a IKBKB y/o CD74 en una muestra biológica de un sujeto que va a someterse a prueba e instrucciones sobre cómo usar dicho kit de prueba. Preferiblemente, dicho kit de prueba es un ensayo ELISA.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: La figura muestra los títulos de autoanticuerpos de tipo anti-IgG frente a CD74 en diferentes enfermedades. El título se considera positivo, si era de 40 U/ml o superior (punto de corte 40 U/ml). De izquierda a derecha, se enumeran los diferentes grupos de prueba: donantes de sangre (BD), espondilitis anquilosante (AS), AS con BASDAI > 4 (índice de actividad de la enfermedad espondilitis anquilosante de Bath, una puntuación de actividad para AS), artritis psoriásica (PsA), artritis reumatoide (RA), lupus eritematoso sistémico (SLE), fiebre.

Figura 2: En la figura 2 se muestra el porcentaje de resultados positivos para autoanticuerpos de tipo anti-IgG frente a CD74 en las siguientes enfermedades: espondilitis anquilosante (AS), AS con BASDAI > 4, donantes de sangre (BD), artritis psoriásica (PsA), artritis reumatoide (RA), lupus eritematoso sistémico (SLE), fiebre, síndrome de dolor crónico (SFS).

Figura 3: La figura muestra los títulos de autoanticuerpos de tipo anti-IgG frente a IKBKB en diferentes enfermedades. El título se considera positivo, si era de 40 U/ml o superior (punto de corte 40 U/ml). De izquierda a derecha, se enumeran los diferentes grupos de prueba: donantes de sangre (BD), espondilitis anquilosante (AS), HIV, lupus eritematoso sistémico (SLE), síndrome de dolor crónico (SFS), artritis psoriásica (PsA), artritis reumatoide (RA), fiebre, AS con BASDAI > 4.

Figura 4: En la figura 4 se muestra el porcentaje de resultados positivos para autoanticuerpos de tipo anti-IgG frente a IKBKB en las siguientes enfermedades: donantes de sangre (BD), espondilitis anquilosante (AS), AS con BASDAI > 4, VIH, lupus eritematoso sistémico (SLE), fiebre, síndrome de dolor crónico (SFS), artritis reumatoide (RA), artritis psoriásica (PsA).

Figura 5: La figura muestra los títulos de autoanticuerpos de tipo anti-IgA frente a CD74 en diferentes enfermedades. El título se considera positivo, si es de 5 U/ml o superior (punto de corte 5 U/ml). De izquierda a derecha, se enumeran los diferentes grupos de prueba: espondilitis anquilosante (AS), psoriasis, donantes de sangre (BD).

Figura 6: La figura muestra un resumen de la sensibilidad y la especificidad para AS de cada autoanticuerpo solo y en combinación y para espondiloartritis indiferenciada.

Descripción detallada de la presente invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar la presencia de o el riesgo de desarrollar, o para el control terapéutico de, espondiloartritis (Spa), en particular espondilitis anquilosante (AS) y espondiloartritis indiferenciada, en un sujeto que comprende

a. obtener del sujeto una muestra biológica, y

b. analizar la muestra para determinar la presencia de autoanticuerpos frente a CD74 y/o IKBKB,

según lo cual la presencia de autoanticuerpos frente a CD74 y/o IKBKB es indicativa de la presencia de o el riesgo de desarrollar, o para el control terapéutico de, Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada.

Es decir, la presente invención se basa en la observación de los presentes inventores de que los sujetos aquejados de Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada, o que corren el riesgo de desarrollar Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada, así como para el control terapéutico de Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada, tienen autoanticuerpos frente a las proteínas CD74 y/o IKBKB, respectivamente.

Con respecto al término "autoanticuerpo" o "autoanticuerpos" quiere decirse un anticuerpo que se dirige contra una o más de las proteínas propias de los sujetos.

IKBKB también se conoce como inhibidor de la subunidad beta del factor nuclear kappa B cinasa o IKK-beta. CD74 también se conoce como la cadena invariante del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II. Es decir, la forma de superficie celular de la cadena invariante se conoce como CD74.

Ambas proteínas se expresan por una variedad de células. Los presentes inventores demuestran que CD74 e IKBKB solas o en combinación representan entidades para las que pueden encontrarse autoanticuerpos en sujetos aquejados de Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada. Por tanto, la determinación de la presencia de autoanticuerpos frente a CD74 y/o IKBKB es indicativa de la presencia de o el riesgo de desarrollar, o para el control

terapéutico de, Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada, en un sujeto. Como se demuestra en los ejemplos, la determinación de autoanticuerpos frente a una de estas moléculas permite identificar individuos que padecen Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada.

5 En particular, en el presente documento se demuestra que la determinación de la presencia de autoanticuerpos frente a CD74 y/o IKBKB permite un diagnóstico específico de Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada, en particular, en fases tempranas, lo cual no era posible anteriormente. Hasta hoy, la Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada, sólo puede diagnosticarse mediante un diagnóstico extenso y costoso, o mediante la exclusión de otras enfermedades, trastornos o estados. Por tanto, por primera vez es posible diagnosticar la presencia de o el riesgo de desarrollar Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada, en un sujeto con un sistema de prueba o kit de prueba simple basado en el método descrito en el presente documento. Adicionalmente, es posible permitir un control terapéutico de sujetos aquejados de Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada.

15 Por ejemplo, la presente invención permite identificar el régimen de terapia de un individuo que lo necesite. Es decir, la identificación de la presencia de autoanticuerpos frente a CD74 y/o IKBKB apunta a una terapia que comprende un empobrecimiento de células B o una inducción de tolerancia en células T.

20 En una realización preferida, se determina la presencia de autoanticuerpos frente a tanto CD74 como IKBKB. Es decir, determinando la presencia de autoanticuerpos frente a tanto CD74 como IKBKB, la especificidad de diagnóstico de AS es de casi el 100%.

25 En otra realización, los métodos según la presente invención permiten diferenciar entre espondiloartropatías seronegativas, concretamente diferenciar entre AS y PsA. A diferencia de los métodos sugeridos previamente para diagnosticar AS, que incluyen normalmente el diagnóstico de PsA y que no permiten la diferenciación entre AS y PsA, la presente invención permite específicamente diagnosticar AS al tiempo que excluye PsA.

30 Los términos “paciente” y “sujeto” se usan de manera intercambiable y hacen referencia a pacientes y sujetos de seres humanos u otros mamíferos e incluyen cualquier individuo que se desee examinar o tratar usando los métodos de la invención. Sin embargo, se entenderá que “paciente” no implica que estén presentes síntomas.

35 El término “muestra biológica” tal como se usa en el presente documento se refiere a una muestra de un paciente que puede extraerse, no tratarse, tratarse, aislarse o concentrarse. De manera adecuada, la muestra biológica se selecciona de cualquier parte del cuerpo de un paciente, incluyendo, pero sin limitarse a, pelo, piel, uñas, tejidos o fluidos corporales, tales como saliva, sinovia y sangre.

A lo largo de toda esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra “comprender” implica la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos estipulado, pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos.

40 Con el término “obtenido de” quiere decirse que una muestra tal como, por ejemplo, suero se aísla de o se deriva de una fuente particular del sujeto. Por ejemplo, el extracto puede obtenerse de un tejido o un fluido corporal aislado directamente del sujeto.

45 Tal como se usa en el presente documento, los términos “un”, “una” y “el/la” significan “uno/a o más” cuando se usa en esta solicitud, incluyendo las reivindicaciones.

50 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente materia dada a conocer.

55 Los términos “diagnosticar” y “diagnóstico” tal como se usan en el presente documento se refieren a métodos mediante los que un experto en la técnica puede estimar e incluso determinar si un sujeto padece o no una enfermedad, trastorno o estado dado. El experto en la técnica hace el diagnóstico basándose en uno o más indicadores de diagnóstico, concretamente autoanticuerpos, cuya cantidad (incluyendo la presencia o ausencia) es un indicador de la presencia, gravedad o ausencia del estado.

60 Junto con el diagnóstico, el control terapéutico y el pronóstico clínico es también un área de gran preocupación e interés. Es importante conocer la gravedad de la enfermedad así como la actividad de la enfermedad con el fin de diseñar la terapia más eficaz.

65 Por tanto, “hacer un diagnóstico” o “diagnosticar”, tal como se usa en el presente documento, puede incluir además hacer un pronóstico que puede proporcionar la predicción de un desenlace clínico, la selección de un tratamiento adecuado o la monitorización de un tratamiento actual, y potencialmente un cambio en el tratamiento basándose en la medida de un autoanticuerpo de diagnóstico.

El término “determinar” o “analizar” tal como se usa en el presente documento se refiere a evaluar la presencia,

ausencia, cuantía, nivel o cantidad de los respectivos autoanticuerpos dentro de la muestra derivada del sujeto, incluyendo niveles de concentración cualitativos o cuantitativos de dichas sustancias, que evalúan por lo demás los valores o la categorización de un parámetro clínico del sujeto.

5 Los inventores han determinado que la producción de autoanticuerpos frente a CD74 y/o IKBKB puede correlacionarse con la presencia de AS y espondiloartritis indiferenciada.

Además, en algunas realizaciones de la materia dada a conocer en el presente documento, pueden hacerse múltiples determinaciones de los autoanticuerpos a lo largo del tiempo para facilitar el diagnóstico y/o el pronóstico.

10 En algunas realizaciones de los métodos dados a conocer en el presente documento, la detección, determinación o análisis de la presencia de los autoanticuerpos en la muestra puede incluir la unión de los autoanticuerpos a un antígeno y después la detección o bien del evento de unión o bien de la presencia del autoanticuerpo aislado de la muestra biológica. Las técnicas a modo de ejemplo para detectar los autoanticuerpos incluyen, pero no se limitan a, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoanálisis (RIA), inmunoensayo múltiple, inmunoprecipitación e inmunotransferencia (incluyendo, por ejemplo, inmunotransferencia de tipo Western y transferencia puntual).

15 El experto conoce ampliamente métodos de inmunodetección útiles que permiten analizar la muestra para determinar la presencia o ausencia de autoanticuerpos frente a CD74 y/o IKBKB. Por ejemplo, la muestra biológica obtenida del sujeto se pone en contacto con un antígeno, concretamente con un oligo-, polipéptido o proteína CD74 y/o IKBKB que representa el péptido inmunorreactivo al autoanticuerpo, por tanto, permitiendo la unión del autoanticuerpo a dicho péptido. En este contexto, el término polipéptido o proteína que se usan de manera intercambiable en el presente documento, hacen referencia a un polímero de aminoácidos que tiene una longitud de al menos 50 aa. El término "oligopéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos que tiene una longitud de desde 5 hasta 49 aa.

20 Poner en contacto la muestra biológica elegida del antígeno en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de inmunocomplejos, es generalmente una cuestión de añadir la composición a la muestra e incubar la mezcla durante un periodo de tiempo suficientemente largo para que los autoanticuerpos formen inmunocomplejos con los antígenos presentados. Dicha mezcla de antígeno-anticuerpo puede detectarse mediante medios y métodos conocidos. Es decir, la detección de formación de inmunocomplejos de antígeno-autoanticuerpo puede conseguirse a través de la aplicación de numerosos enfoques. Estos métodos se basan generalmente en la detección de una etiqueta o marcador, tal como cualquier etiqueta o marcador radiactivo, fluorescente, biológico o enzimático de uso convencional en la técnica. Naturalmente, pueden encontrarse ventajas adicionales a través del uso de un ligando de unión secundario tal como un segundo anticuerpo o una disposición de unión a ligando de biotina/avidina (estreptavidina) tal como se conoce en la técnica.

30 En algunas realizaciones, el inmunocomplejo primario puede detectarse mediante un segundo ligando de unión que tiene afinidad de unión por el antígeno o el autoanticuerpo presentado en la muestra, por ejemplo reactividad con la región Fc de los autoanticuerpos o que tiene reactividad con una región del antígeno diferente de la región de unión del autoanticuerpo. En estos casos, el segundo ligando de unión puede unirse a una molécula de etiqueta o marcador detectable. El segundo ligando de unión es en sí mismo a menudo un anticuerpo, que por tanto puede denominarse anticuerpo secundario. Normalmente, los inmunocomplejos primarios se ponen en contacto con el anticuerpo o ligando de unión secundario etiquetado, en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de inmunocomplejos secundarios. Los inmunocomplejos secundarios se lavan entonces generalmente para eliminar cualquier ligando o anticuerpo secundario etiquetado no unido, y entonces se detecta la etiqueta restante en el inmunocomplejo secundario.

40 El segundo ligando de unión, tal como un anticuerpo, que tiene actividad de unión para o bien el antígeno o bien el autoanticuerpo, también puede usarse para unirse a los inmunocomplejos primarios. El segundo ligando de unión contiene una enzima que puede procesar un sustrato detectable para dar un producto y, por tanto, amplificar una señal a lo largo del tiempo. Tras el lavado, los inmunocomplejos secundarios se ponen en contacto con el sustrato, permitiendo la detección.

45 Alternativamente puede usarse una inmunodetección comparativa. El experto en la técnica conoce ampliamente métodos adecuados.

50 Se prefiere particularmente que la muestra biológica sea un fluido corporal, preferiblemente sangre. En particular, la muestra biológica es suero del sujeto que va a diagnosticarse.

55 Tal como se explicó de manera resumida anteriormente, el método según la presente invención es particularmente útil para permitir la diferenciación entre AS y PsA. Adicionalmente, en otra realización, los métodos según la presente invención permiten la estratificación del régimen terapéutico de un sujeto aquejado de Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada, o que corre el riesgo de desarrollar Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada. Es decir, la presente invención permite identificar el estado de la enfermedad, en particular, el estado activo de la

enfermedad en un sujeto aquejado de Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada.

Los autoanticuerpos que van a detectarse pueden ser del tipo anti-IgA y/o IgG. Es decir, es posible determinar la presencia de autoanticuerpos anti-IgA y/o IgG en la muestra biológica obtenida del sujeto. Aunque es suficiente detectar sólo un tipo de anticuerpos, autoanticuerpos o bien anti-IgA o bien anti-IgG, se prefiere que se detecten ambos autoanticuerpos anti-IgA y anti-IgG frente a CD74 e IKBKB.

En una realización particular preferida, el sujeto es un ser humano y los autoanticuerpos son autoanticuerpos humanos.

En una realización adicional, la materia dada a conocer en el presente documento proporciona kits de prueba o kits de diagnóstico para su uso en un método según la presente invención. En particular, kits inmunológicos para su uso en la detección de autoanticuerpos en muestras biológicas que permiten el diagnóstico de Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada. Es decir, la presente invención proporciona un kit de prueba para su uso en un método según la presente invención para diagnosticar la presencia de o el riesgo de desarrollar, así como para el control terapéutico de, Spa, como AS, en un sujeto que comprende medios para determinar autoanticuerpos frente a IKBKB y/o CD74 en una muestra biológica de un sujeto que va a someterse a prueba e instrucciones sobre cómo usar el kit de prueba. En una realización preferida, dicho kit de prueba es un ELISA.

Tales kits pueden comprender generalmente uno o más antígenos, concretamente, oligo- o polipéptidos de CD74 y/o IKBKB que pueden inmunorreaccionar con los autoanticuerpos. Normalmente, los kits de inmunodetección comprenderán en recipiente(s) adecuado(s), uno o más antígenos de péptidos inmunorreactivos con autoanticuerpos derivados de CD74 y/o IKBKB. Dichos antígenos útiles en los métodos y kits de prueba reivindicados en el presente documento pueden ser la proteína CD74 y/o IKBKB completa o péptidos inmunorreactivos derivados de las mismas.

En determinadas realizaciones, el antígeno puede proporcionarse unido a un soporte sólido, tal como por ejemplo una matriz de columna o un pocillo de una placa de microtitulación, una membrana, perlas, tiras reactivas o similares. Alternativamente, el soporte puede proporcionarse como un elemento separado del kit.

Es decir, el kit de prueba según la presente invención para diagnosticar Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada, incluye, además del antígeno, un agente de detección para los autoanticuerpos que puede ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, etc. Además, el kit puede comprender más de un agente de detección. Si se requiere, el kit comprende además un sustrato y medios adicionales para permitir la reacción con una enzima usada como etiqueta para el agente de detección que puede ser un anticuerpo.

Los agentes de inmunodetección del kit pueden incluir etiquetas detectables que están asociadas con o unidas al agente de detección dado, en particular, el anticuerpo de detección. También se contemplan etiquetas detectables que están asociadas con o acopladas a un ligando de unión secundario. Las etiquetas detectables incluyen colorantes, moléculas luminiscentes o fluorescentes, biotina, radioetiquetas o enzimas. Los ejemplos típicos para etiquetas adecuadas incluyen las moléculas fluorescentes conocidas comúnmente, como rodamina, fluoresceína, proteína verde fluorescente o luciferasa, o fosfatasa alcalina y peroxidasa del rábano como ejemplos de enzimas adecuadas.

Opcionalmente, los kits comprenden además controles positivos y negativos para verificar los resultados obtenidos cuando se usa el kit. Los componentes de los kits pueden envasarse o bien en medio acuoso o bien en forma liofilizada y, además, los kits comprenden uno o más recipientes que permiten llevar a cabo la detección. Además, el kit de prueba comprende instrucciones para el uso del kit.

En este contexto, el término "péptidos inmunorreactivos" se refiere a fragmentos de péptido de IKBKB y/o CD74 que permiten la unión con los autoanticuerpos derivados del sujeto.

Ejemplos

Se han incluido los siguientes ejemplos para ilustrar modos de la presente materia dada a conocer. A la luz de la presente divulgación y el nivel general del experto en la técnica, los expertos apreciarán que los siguientes ejemplos pretenden ser sólo a modo de ejemplo y que pueden emplearse numerosos cambios, modificaciones y alteraciones sin apartarse del alcance de la presente materia dada a conocer.

Ejemplo 1

Se examinaron 45 sueros de pacientes con diferentes enfermedades inflamatorias y reumáticas por medio de la tecnología de microdisposición de proteínas. Se han identificado dos nuevos marcadores de espondiloartritis, que se han evaluado adicionalmente para determinar sus frecuencias y asociaciones mediante diferentes ELISA.

Se efectuó una evaluación con sueros de 34 pacientes con AS, 10 con espondiloartritis indiferenciada y de 55

donantes de sangre. Los pacientes se habían caracterizado ampliamente en cuanto a la actividad de la enfermedad, los datos demográficos y el tratamiento. Se habían almacenado los sueros de los pacientes y de los controles en un congelador a -20°C hasta su uso.

5 Para realizar las pruebas de ELISA, se recubrieron placas de 96 pocillos (Nunc Maxisorb) con 20 µg de CD74 de longitud completa recombinante de *E. coli* con etiqueta GST, Abnova GmbH, Alemania, y un polipéptido sintético de CD74, Abcam, EE.UU., o con 20 µg de IKBKB de longitud completa recombinante con etiqueta GST, Abnova GmbH, Alemania. Se incubaron las placas con sueros con una dilución 1:100 en PBS durante de 30 a 60 minutos a temperatura ambiente. Como patrón se usó un suero de un paciente con AS sumamente activa. Se definió la
10 concentración de anticuerpos en este suero como 100 U/ml para los autoanticuerpos frente a CD74 e IKBKB de tipo anti-IgG y como 10 U/ml para los autoanticuerpos frente a CD74 de tipo anti-IgA. Después de 30 a 60 minutos de incubación, se lavaron las placas 3 veces con PBS. A continuación, se añadieron 100 µl de un anticuerpo de cabra anti-IgG humana secundario (KPL inc, EE.UU.) con una dilución 1 µg/ml o 100 µl de anticuerpo anti-IgA humana etiquetado con fosfatasa alcalina, Antikörper-online, Alemania, con una dilución 1:1000. Se incubaron las placas
15 durante 30 min a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con PBS. Se realizó la reacción colorimétrica con Blue-Phos, KPL, durante hasta 15 min según las instrucciones del fabricante y se leyeron las DO a 620nm en un lector de ELISA.

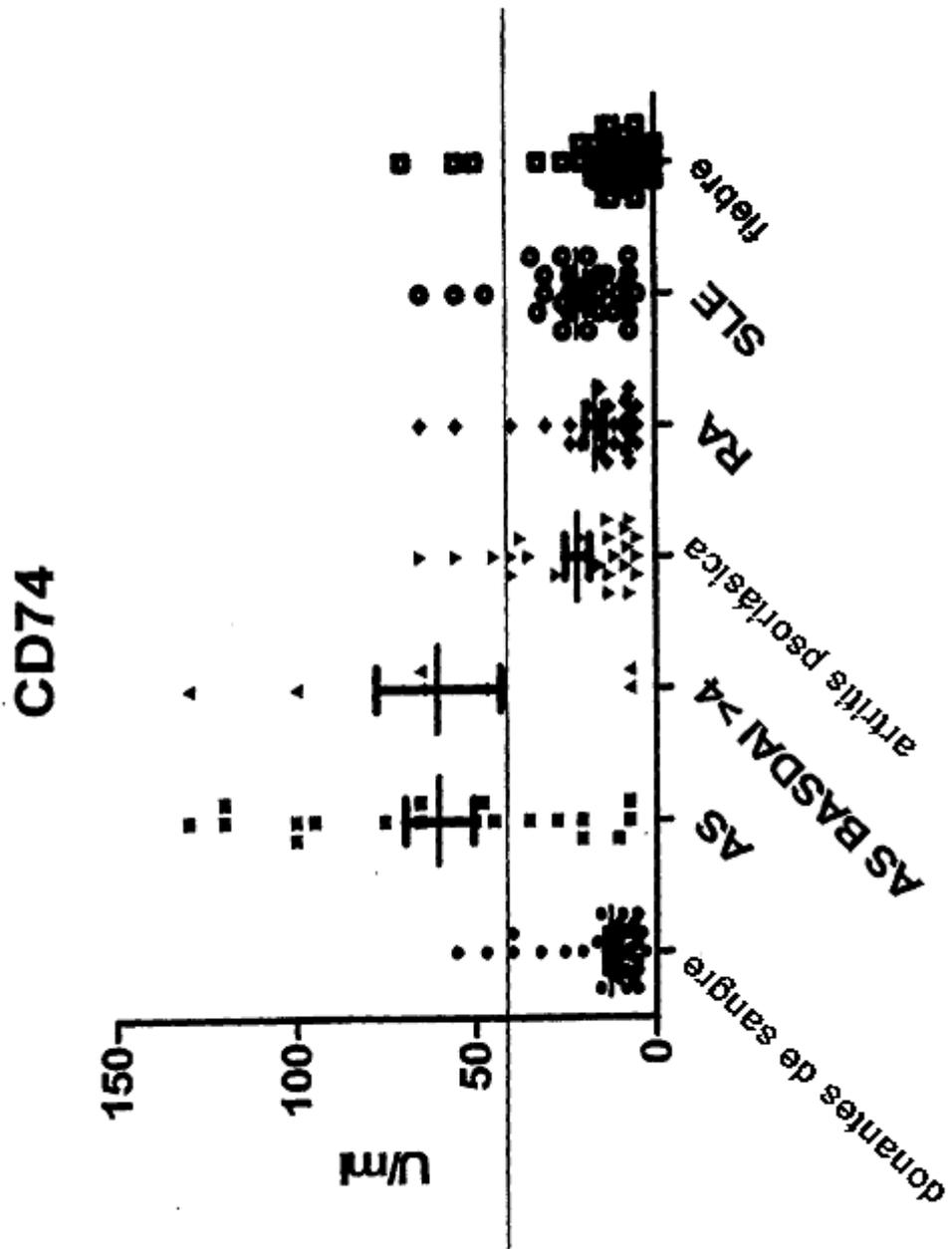
20 En las primeras pruebas, la prueba para autoanticuerpos de tipo anti-IgG frente a IKBKB tenía una sensibilidad para la AS del 66% (20 de 29 pacientes con AS) y una especificidad del 96% (3 de 78 donantes de sangre), la prueba para los autoanticuerpos de tipo anti-IgG frente a CD74 tenía una sensibilidad para la AS del 65% (13 de 20 pacientes con AS) y una especificidad del 96% (2 de 55 donantes de sangre), la prueba para los autoanticuerpos de tipo anti-IgA frente a CD74 tenía una sensibilidad para la AS del 85,5% (29 de 34 pacientes con AS) y una especificidad del 92% (4 de 48 donantes de sangre). Si se combinan estas pruebas, la sensibilidad alcanza el 60% y
25 la especificidad es del 100%. Además, 8 de 10 individuos con espondiloartritis indiferenciada eran positivos para autoanticuerpos de tipo anti-IgG e IgA frente a CD74 (sensibilidad del 80%). Esto indica que los autoanticuerpos están presentes antes de que puedan detectarse radiológicamente determinados cambios.

30 Además se sometieron a prueba diferentes enfermedades autoinmunitarias y otras enfermedades como SLE, RA, SFS, fiebre, psoriasis. En estos grupos, la frecuencia era de entre el 5 y el 15%. Esto indica una alta especificidad para el diagnóstico de Spa, en particular AS y espondiloartritis indiferenciada.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para diagnosticar la presencia de o para diagnosticar el riesgo de desarrollar, o para el control terapéutico de, espondiloartritis (Spa), como espondilitis anquilosante (AS) y espondiloartritis indiferenciada, en un sujeto que comprende, sobre una muestra biológica obtenida del sujeto, analizar la muestra para determinar la presencia de autoanticuerpos frente a CD74 y/o IKBKB,
según lo cual la presencia de autoanticuerpos frente a CD74 y/o IKBKB es indicativa de la presencia de o el riesgo de desarrollar, o para el control terapéutico de, Spa, como AS.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra biológica del sujeto se analiza para determinar la presencia de autoanticuerpos frente a CD74 e IKBKB.
- 15 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque se detectan autoanticuerpos anti- IgA y/o IgG.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el sujeto es un ser humano y los autoanticuerpos son autoanticuerpos humanos.
- 20 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la detección se realiza usando un inmunoensayo, preferiblemente con acoplamiento directo o indirecto de un reactante a una sustancia marcadora detectable.
- 25 6. Método según la reivindicación 5, caracterizado porque la detección se lleva a cabo usando un ELISA, RIA, inmunoensayo múltiplex o ensayo de inmunofluorescencia, inmunotransferencia de tipo Western, ensayo lineal, ensayo de transferencia puntual.
- 30 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra biológica se selecciona de sangre, tejido o fluido, seleccionado preferiblemente de pelo, piel, uñas, saliva, sinovia, líquido cefalorraquídeo y sangre.
8. Método según la reivindicación 7, en el que la muestra biológica es un fluido corporal, preferiblemente sangre, en particular, suero.
- 35 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la estratificación del régimen terapéutico de un sujeto aquejado de Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada, o que corre el riesgo de desarrollar Spa, como AS.
- 40 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para identificar el estado de la enfermedad, en particular, la actividad de la enfermedad en un sujeto aquejado de Spa, como AS y espondiloartritis indiferenciada.
- 45 11. Kit de prueba para su uso en un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende medios para determinar autoanticuerpos frente a IKBKB y/o CD74 en una muestra biológica de un sujeto que va a someterse a prueba e instrucciones sobre cómo usar dicho kit de prueba.
12. Kit de prueba según la reivindicación 11, que es un ELISA, RIA, inmunoensayo múltiplex, inmunotransferencia o transferencia puntual.

Figura 1



Sensibilidad y especificidad para autoanticuerpos anti-IgG frente a CD74

Figura 2

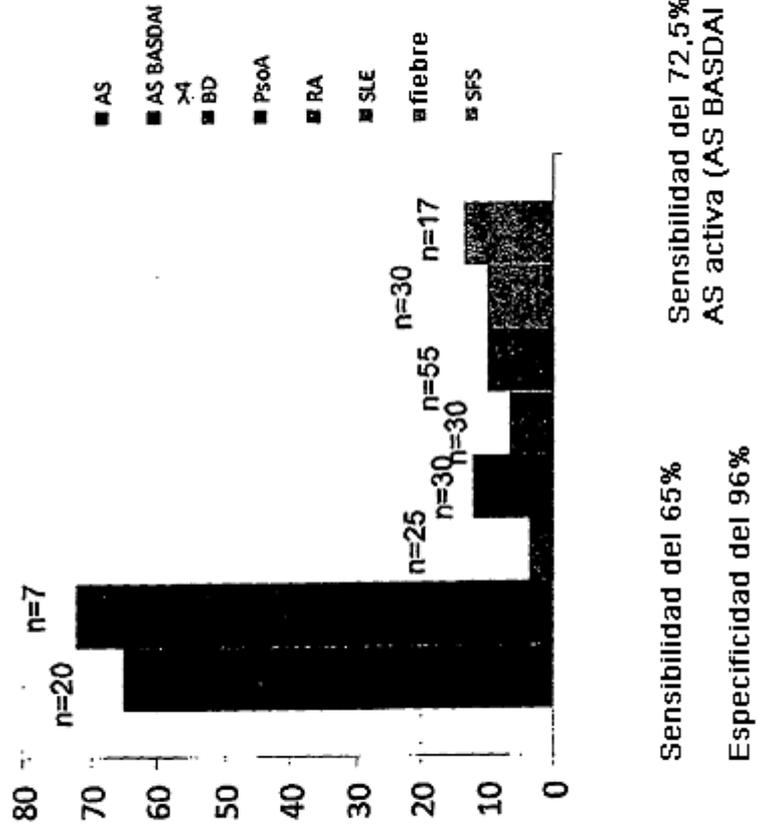
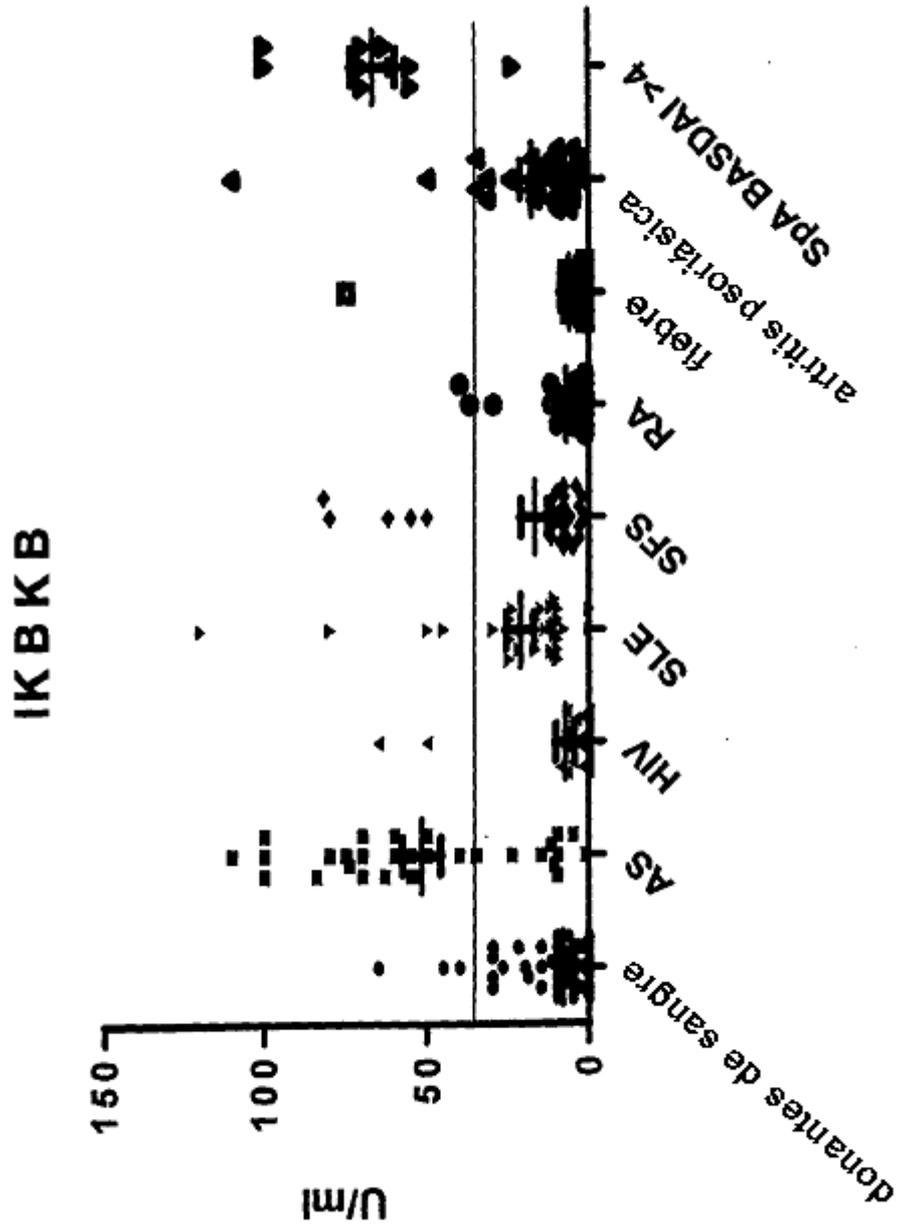


Figura 3



Sensibilidad y especificidad de IKBKB

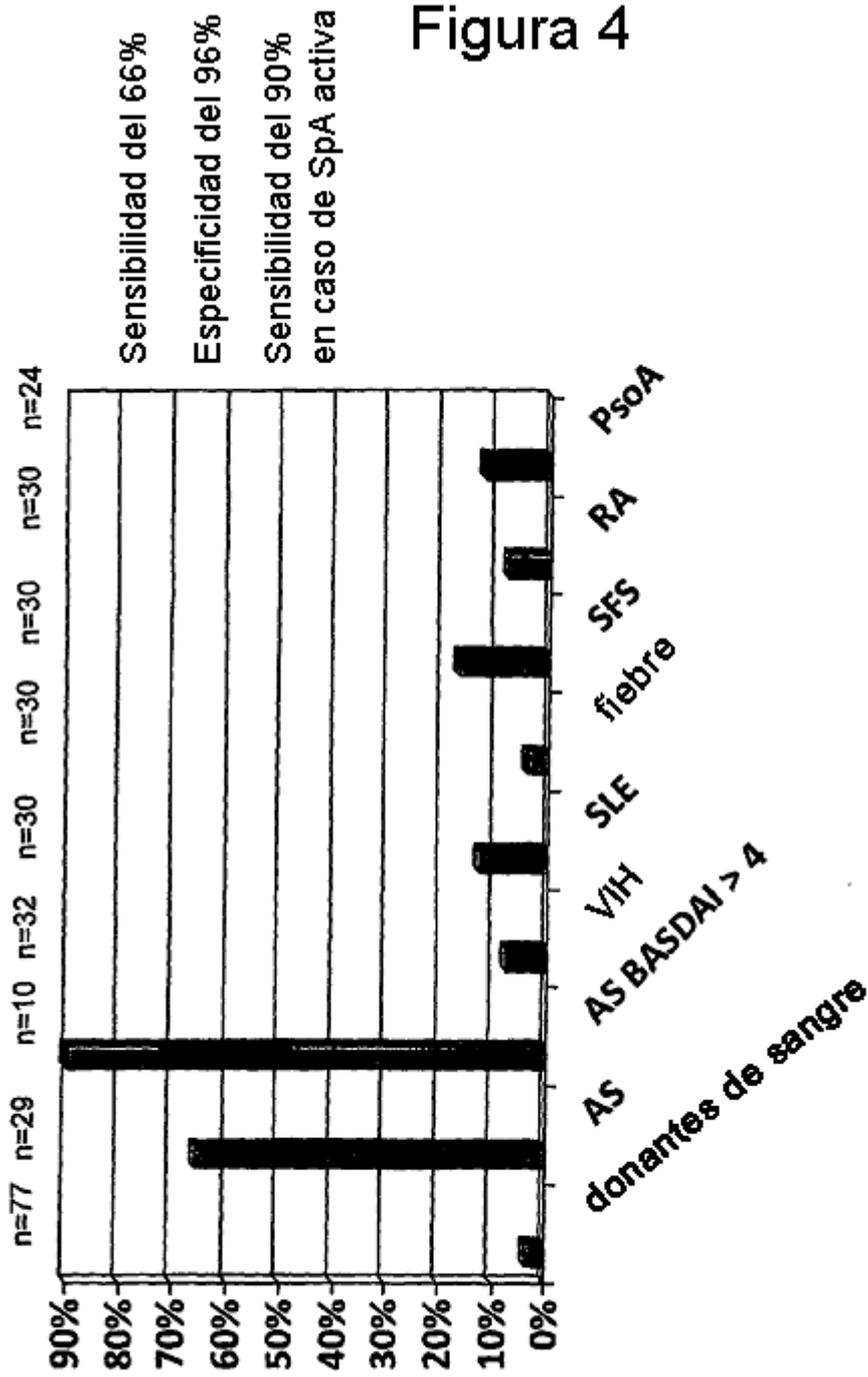


Figura 4

Autoanticuerpo frente a CD74 anti-IgA

Figura 5

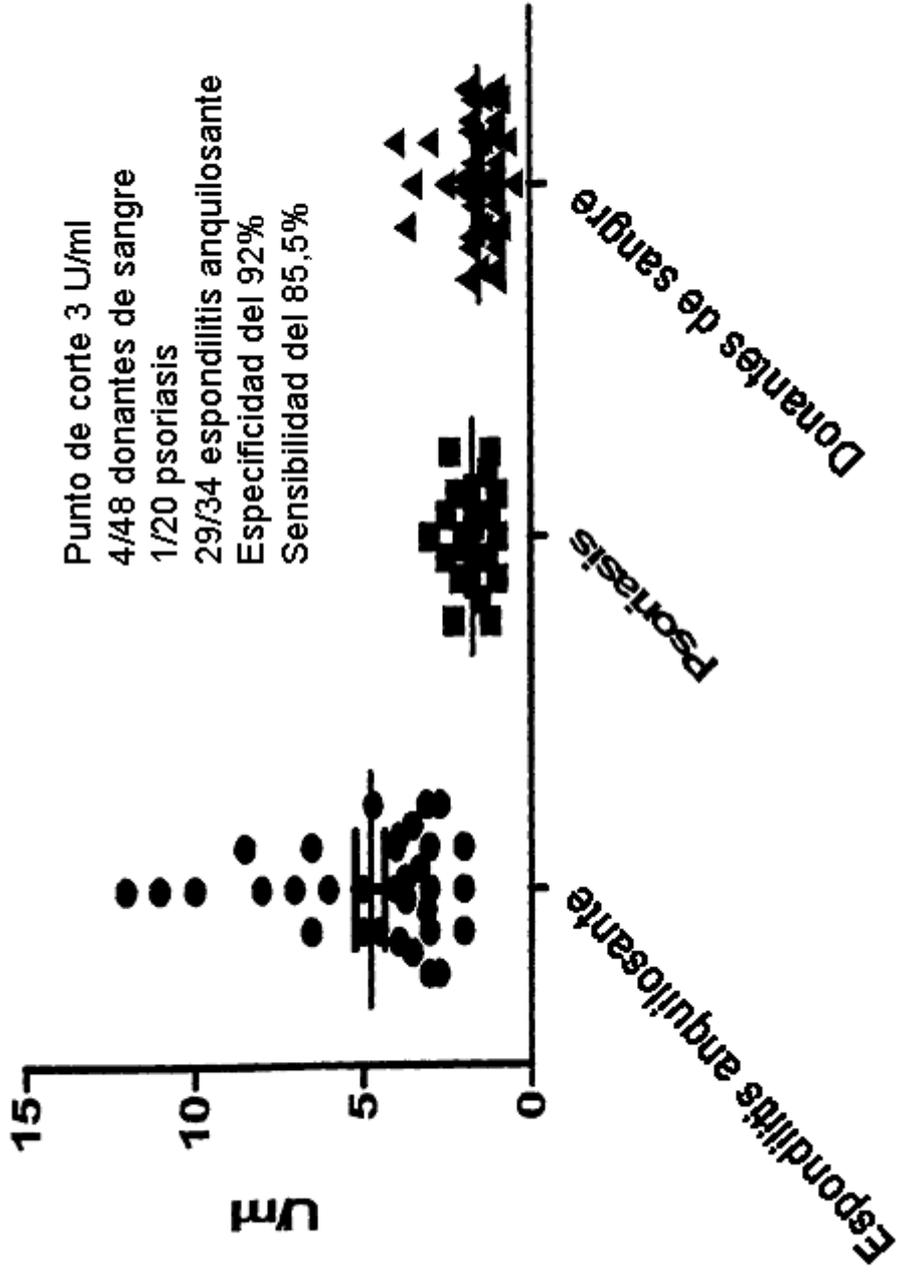


Figura 6

Resumen

	Autoanti- cuerpo anti- IgG frente a CD74	Autoanti- cuerpo anti- IgA frente a CD74	Autoanti- cuerpo anti- IgG frente a IKKB	Autoanticuerpo anti-IgG frente a CD74 + anti-IgA + anti-IgG frente a IKKB + combinación	Positivos para autoanti- cuerpo anti- IgG frente a CD74 o anti- IgA o anti-IgG frente a IKKB
Sensibilidad	65% AS/ 80% USpA	85,5% AS/ 80% USpA	66%	60%	97%
Especificidad	96%	92%	96%	100%	72%

Espondilitis anquilosante (AS)
Espondiloartritis indiferenciada (USpA)