

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 094**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2008 E 13181094 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2666873**

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

30 Prioridad:

12.07.2007 US 929775 P

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

19.04.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GREENBERG, STEVEN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 567 094 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para diagnosticar y evaluar las miopatías inflamatorias

Campo de la invención

5 La invención pertenece al campo de los métodos que se pueden usar para determinar si un sujeto exhibe un perfil de expresión génica característico de las miopatías inflamatorias.

Antecedentes de la invención

10 Las miopatías inflamatorias son un grupo de enfermedades que implican la inflamación de los músculos o los tejidos asociados, y que se caracterizan principalmente por debilidad, atrofia muscular y, a veces, dolor. Los tres subtipos principales de miopatías inflamatorias son la dermatomiositis (DM), polimiositis (PM), y miositis por cuerpos de inclusión (MCI). PM y DM son clínicamente similares, excepto porque DM está asociada a erupciones cutáneas, mientras PM no lo está. Aunque DM se ha caracterizado como una enfermedad provocada por el ataque de anticuerpos hacia antígenos endoteliales (Dalakas, *et al.*, *Lancet* 362(9388):971-82 (2003)), no se han identificado anticuerpos patógenos o antígenos endoteliales bien caracterizados (Greenberg, *et al.*, *Curr. Opin. Neurol.* 17(3):359-64 (2004)).

15 MCI a menudo se diagnostica erróneamente como PM pero, a diferencia de PM o DM, en general no responde al tratamiento con fármacos inmunosupresores. El diagnóstico de MCI se basa normalmente en los resultados de biopsias que revelan células musculares con cuerpos de inclusión, es decir, con vacuolas que contienen proteína amiloide. Actualmente no existe ningún tratamiento eficaz para MCI, pero los pacientes a veces se pueden beneficiar de la administración de prednisona o inmunoglobulina intravenosa (IGIV).

20 El perfil de expresión génica del músculo en DM en adultos en comparación con otras miopatías inflamatorias y controles sanos normales ha revelado un distintivo transcripcional génico que está dominado por la estimulación de genes inducibles por interferón- α/β (IFN- α/β) (Greenberg, *et al.*, *Ann. Neurol.* 57(5):664-78 (2005)). Las células dendríticas plasmocitoides (CDPs), células productoras de IFN- α/β naturales, están presentes en el músculo de DM. La proteína inducida por interferón- α/β , MxA, se expresa en las miofibrillas y capilares perifasciculares. Estas observaciones sugieren que la lesión tisular en DM procede de una sobreactivación autodestructiva del sistema inmunitario innato (Greenberg, *et al.*, *Ann. Neurol.* 57(5):664-78 (2005)). La caracterización adicional de los patrones de expresión génica en DM, PM y MCI puede conducir a métodos mejores para distinguir las miopatías inflamatorias entre sí y de otras enfermedades caracterizadas por la debilidad muscular progresiva.

Sumario de la invención

30 La presente invención se basa en la medida cuantitativa de los transcritos de ARN en sangre producidos por el gen IFI44L. Un nivel elevado de este transcrito tiene un valor predictivo positivo elevado para un diagnóstico de dermatomiositis o polimiositis, y excluye un diagnóstico de miositis por cuerpos de inclusión (MCI) de la miopatía inflamatoria relacionada. Los niveles elevados de transcritos para este gen no se observan en otras afecciones musculares, tales como la distrofia muscular o la miastenia gravis, que puede ser importante distinguir en el diagnóstico.

35 En su primer aspecto, la invención se dirige a un método para determinar si un sujeto exhibe un patrón de expresión génica característico de polimiositis o dermatomiositis y no característico de miositis por cuerpos de inclusión (MCI), que comprende (a) analizar una muestra biológica de ensayo de células mononucleares de sangre periférica para medir la expresión del gen de la proteína 44 similar inducida por interferón (IFI44L); y (b) llegar a la conclusión de que dicho sujeto tiene un perfil de expresión génica que es característico de dermatomiositis o polimiositis, y que no es característico de MCI, si los resultados determinados en el análisis indican que el gen IFI44L se expresa al menos 10 veces más en dicha muestra de ensayo que en una o más muestras de control.

40 Preferiblemente, el método comprende además analizar la muestra de ensayo para medir la expresión de uno o más genes adicionales seleccionados del grupo que consiste en: dominio del radical S-adenosilo/CIG5, proteína 27 inducible por interferón alfa, proteína 44 inducida por interferón; proteína hipotética LOC129607; 2',5'-oligoadenilato sintetasa 1; factor 1 asociado a XIAP; tetratricopéptido 5 inducido por interferón; 2'-5'-oligoadenilato sintetasa similar; 2'-5'-oligoadenilato sintetasa 3; tetratricopéptido 1 inducido por interferón; fosfolípido escramblasa 1; dominio HECT y RLD 5; proteína quinasa inducible por interferón; miembro 10 de la superfamilia de TNF; proteína 1 de unión a guanilato; proteína 6 inducida por TNF-alfa; tetratricopéptido 3 inducido por interferón; dominio 9 similar del motivo alfa estéril; proteína 5 modificadora de cromatina; modificador similar a ubiquitina ISG15; 2'-5'-oligoadenilato sintetasa 2; dominio 1 de helicasa C inducida por interferón; resistencia 1 a mixovirus; y gen 1 de interacción epitelial-estromal. Los nombres de los genes, las abreviaturas de cada uno y los números de acceso para las secuencias en las bases de datos UniGene y GenBank se proporcionan en la Tabla 4.

55 Para los fines de la presente invención, los análisis para determinar el nivel de expresión de un gen se pueden dirigir a ácidos nucleicos (p.ej., mediante el uso de amplificación por PCR del mRNA) o a productos génicos (p.ej., mediante el uso de un ELISA o un radioinmunoensayo). Los resultados obtenidos mediante el uso de la muestra de

ensayo se comparan con los resultados de una o más muestras de control seleccionadas mediante el uso de criterios muy conocidos en la técnica. Las muestras de control pueden ser, por ejemplo, muestras de sangre, suero o plasma obtenidas de individuos que se sabe que no tienen una miopatía inflamatoria u otra enfermedad muscular, o se pueden tomar de la población en conjunto y, opcionalmente, hacerlas coincidir con la muestra de ensayo con respecto a la edad del sujeto, el sexo, etc. Comparando los resultados de los controles y de la muestra de ensayo, se puede extraer una conclusión con respecto a si el sujeto tiene una miopatía inflamatoria y, si está presente, el tipo particular de miopatía inflamatoria. Cuantos más genes exhiban diferencias y mayor sea la magnitud de las diferencias, mayor será el riesgo de que un sujeto sea positivo para la enfermedad. Preferiblemente, los análisis se llevarán a cabo en al menos 5 genes y, más preferiblemente, al menos 15 genes. Un incremento de al menos 10 veces en las muestras obtenidas de los sujetos, en comparación con los controles, se debería observar en general en pacientes con una miopatía inflamatoria, y los mayores incrementos (20 a 50 veces) son más característicos de DM o PM. Los genes más preferidos enumerados en la Tabla 2 son los que exhiben la mayor diferencia en nivel de expresión en los individuos que portan la enfermedad respecto de los controles.

En una realización preferida, el método de la invención se lleva a cabo mediante el uso de una placa o portaobjetos de micromatriz que tiene una serie de oligonucleótidos diferentes inmovilizados que reconocen las secuencias de los genes enumerados anteriormente. El término "diferente" indica que los oligonucleótidos tienen secuencias diferentes que les permiten hibridar con diferentes secuencias complementarias. Se conocen muchos métodos en la técnica para producir placas o portaobjetos de esta naturaleza, y cualquiera de estos métodos son compatibles con la presente invención. Las placas o portaobjetos deben incluir oligonucleótidos inmovilizados que se hibridan en condiciones rigurosas con al menos uno de los genes expuestos anteriormente, y, preferiblemente, los portaobjetos incluyen varios oligonucleótidos diferentes que se unen a genes diferentes. La expresión "condiciones rigurosas" indica condiciones que básicamente permiten solamente que ocurra la hibridación con la secuencia complementaria exacta del oligonucleótido inmovilizado. En general, estas hibridaciones se llevan a cabo en tampones de pH aproximadamente neutro que contienen 0,1-0,5 de NaCl y a una temperatura de entre 45 y 70 °C. También es posible llevar a cabo las incubaciones en condiciones de baja rigurosidad y después usar condiciones de lavado de alta rigurosidad para provocar la disociación de las secuencias hibridadas que no son exactamente coincidentes. Los procedimientos para llevar a cabo las incubaciones de este tipo con respecto a las placas o portaobjetos de micromatrices se conocen bien en la técnica.

Cada grupo de oligonucleótidos inmovilizados que hibridan con un gen específico ocupará una posición distinta en la placa o portaobjetos de micromatriz y, en total, no debería haber presentes más de 100 oligonucleótidos diferentes. En las realizaciones preferidas, hay al menos 10 oligonucleótidos diferentes inmovilizados en placas que hibridan en condiciones rigurosas con genes diferentes, y se prefieren al menos 15 de tales oligonucleótidos inmovilizados. Por razones económicas, también se prefiere que el número total de secuencias inmovilizadas presentes sea 100 o menos, más preferiblemente 50 o menos.

Las placas de micromatrices descritas se usan preferiblemente para llevar a cabo cualquiera de los métodos de análisis de muestras discutidos en la presente memoria. Una manera de llevar a cabo un análisis implicaría lisar las células y después amplificar el mRNA liberado en presencia de un marcador detectable, p.ej. un nucleótido unido a un colorante u otro marcador y presente en un cebador de PCR. Así, se obtiene una población de cADNs marcados que se pueden usar directamente en hibridaciones con oligonucleótidos inmovilizados en una placa o portaobjetos de micromatriz. También es posible comparar dos poblaciones diferentes de mARNs llevando a cabo una PCR en presencia de colorantes diferentes para cada población. Después de completar las hibridaciones, las placas se analizan mediante el uso de un lector automatizado para determinar la cantidad de marcador asociado a cada secuencia inmovilizada, lo que refleja la abundancia de la secuencia hibridada en el lisado original. Se han descrito muchas variaciones de este procedimiento básico en la técnica, y son compatibles con la presente invención.

Descripción detallada de la invención

I. Preparación de muestras para el uso en hibridaciones

Se pueden obtener muestras que contienen células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), lisarlas y extraerlas para obtener ARN mediante el uso de los procedimientos descritos en la presente memoria y que son habituales en la técnica. Los análisis se pueden llevar a cabo mediante el uso de procedimientos habituales descritos por los fabricantes de placas de micromatrices y, en general, como describió previamente Greenberg, *et al.*, *Neurology* 59(8):1170-82 (2002)). De manera alternativa, se puede obtener mRNA de células musculares obtenidas durante biopsias y analizarlo.

II. Materiales de micromatrices y análisis

Todos los genes identificados en la presente memoria como alterados en los pacientes con polimiositis o dermatomiositis estuvieron presentes en las placas de Affymetrix descritas en la sección de Ejemplos. En principio, se podrían usar las mismas placas para evaluar el mRNA de PBMCs o de células musculares. Sin embargo, ya que las placas usadas incluyen oligonucleótidos inmovilizados para miles de genes diferentes, el sistema es poco práctico e innecesariamente caro. Las placas más adecuadas para el análisis discutido en la presente memoria se pueden producir centrándose en los genes enumerados en la Tabla 2. Así, se pueden usar placas similares a las

placas de Affymetrix, en las mismas condiciones de análisis, pero solamente con un pequeño número de sitios de hibridación diferentes (p.ej., 5-50 ó 5-100). Esto simplifica el análisis y permite incluir duplicados para comprobar mejor la coherencia de los resultados.

5 Aunque se podrían usar los mismos procedimientos y materiales descritos por Affymetrix con respecto a la presente invención, también hay disponibles otras alternativas. Se han escrito muchas revisiones que detallan los métodos para producir micromatrices y para llevar a cabo los análisis (véanse, p.ej., Bowtell, *Nature Genetics Suppl.* 21:25-32 (1999); Constantine, *et al.*, *Life Sci. News* 1:11-13 (1998); Ramsay, *Nature Biotechnol.* 16:40-44 (1998)). Además, se han expedido patentes que describen técnicas para producir placas de micromatrices, portaobjetos e instrumentos relacionados (documentos U.S. 6.902.702; U.S. 6.594.432; U.S. 5.622.826) y para llevar a cabo los análisis (documentos U.S. 6.902.900; U.S. 6.759.197). Las dos técnicas principales para producir placas o portaobjetos implican métodos poliligráficos (véanse los documentos U.S. 5.445.934; U.S. 5.744.305) o métodos robóticos de transferencia (documento U.S. 5.807.522). Otros procedimientos pueden implicar la impresión con inyección de tinta o transferencia capilar (véanse, p.ej., los documentos WO 98/29736 o WO 00/01859).

15 El sustrato usado para las placas o portaobjetos de micromatrices puede ser cualquier material capaz de unir e inmovilizar los oligonucleótidos, lo que incluye plástico, metales tales como platino y vidrio. Un sustrato preferido es vidrio revestido con un material que favorece la unión de los oligonucleótidos, tal como polilisina (véase Chena, *et al.*, *Science* 270:467-470 (1995)). Se han descrito muchos esquemas para unir de manera covalente oligonucleótidos, y son adecuados para el uso con respecto al método de la presente invención (véase, p.ej., el documento U.S. 6.594.432). Los oligonucleótidos inmovilizados deberían tener, como mínimo, una longitud de 20 bases y deberían tener una secuencia que corresponda exactamente a un segmento del gen seleccionado como objetivo para la hibridación.

III. Comentarios con respecto a la metodología adicional

25 Aunque se pueden usar los métodos descritos anteriormente para determinar el nivel de expresión génica en PBMCs, se puede usar cualquier otro procedimiento para llevar a cabo este análisis con respecto a la invención. Por ejemplo, se pueden usar técnicas de transferencia de ADN, con o sin amplificación mediante PCR, para cuantificar los niveles de los genes. Se pueden usar transferencias de Western o inmunoensayos para cuantificar los productos génicos y, en algunos casos, se pueden usar análisis basados en enzimas. El nivel de expresión se puede valorar también mediante técnicas de inmunofluorescencia o análisis con indicadores basados en un promotor. El elemento esencial del procedimiento no es cómo se lleva a cabo la cuantificación, sino los genes particulares que se están examinando y la determinación de si esos genes se están expresando a un nivel característico de la presencia o del estado de PM o DM, y no característico de MCI.

V. Comentarios con respecto a la utilidad

35 Los análisis descritos en la presente memoria están diseñados para valorar si las PBMCs tienen un perfil de expresión génica característico de polimiositis o dermatomiositis, y no característico de miositis por cuerpos de inclusión. Esto claramente tiene un gran valor para los científicos que están estudiando estas enfermedades, y para los clínicos que tratan de realizar un diagnóstico o determinar si un régimen de tratamiento o fármaco está teniendo un efecto beneficioso.

Ejemplos

40 Se usaron micromatrices de todo el genoma de Affymetrix para medir la expresión de aproximadamente 38.500 genes en 65 muestras de sangre y 15 muestras de músculo de 56 sujetos con dermatomiositis, polimiositis, miositis por cuerpos de inclusión, miastenia gravis, distrofia muscular y voluntarios sanos. Además, se compararon nueve muestras de sangre emparejadas de los mismos individuos tomadas en momentos diferentes con actividades diferentes de la enfermedad. Se usaron técnicas de bioinformática para identificar los genes con una expresión génica diferencial significativa entre las categorías de diagnóstico y en relación a la actividad de la enfermedad. Los datos de las micromatrices se corroboraron con PCR cuantitativa en tiempo real.

45 Se descubrió que la mayoría de los pacientes con dermatomiositis y polimiositis activas, pero no los pacientes con miositis por cuerpos de inclusión, tenían una estimulación significativa y elevada de los genes inducibles por interferón- α/β de tipo 1 en la sangre. Además, la estimulación de estos genes se correlaciona con la actividad de la enfermedad en dermatomiositis y polimiositis, y se da una inhibición cuando la enfermedad se controla con el tratamiento.

Materiales y métodos:

Sujetos de estudio

55 Se llevaron a cabo 65 experimentos con micromatrices en muestras de sangre de un total de 56 sujetos incorporados de manera prospectiva, de los cuales 36 tenían miopatías inflamatorias (12 con DM, 11 con PM, y 13 con MCI). Para los grupos de control adicionales, se estudiaron cinco pacientes con miastenia gravis, una miopatía autoinmunitaria no inflamatoria, tres pacientes con miopatías determinadas genéticamente (dos con distrofia

miotónica de tipo 2 y uno con miopatía mitocondrial), y 12 voluntarios sanos. Seis pacientes con DM y dos con PM proporcionaron segundas muestras de sangre para los experimentos con micromatrices llevados a cabo en dos momentos diferentes, uno en el que hubo enfermedad activa, y el otro cuando la enfermedad estaba mejorando; un paciente con DM refractaria proporcionó dos muestras en momentos diferentes, ambos cuando hubo enfermedad activa. Todos los pacientes cumplieron los criterios de investigación de DM o PM definida o probable (Hoogendijk, *et al.*, *Neuromuscul. Disord.* 14(5):337-45 (2004)) y MCI definida o posible (Griggs, *et al.*, *Ann. Neurol.* 38(5):705-13 (1995)). Se excluyeron los pacientes con lupus eritematoso sistémico. Las características clínicas de los pacientes con DM (edad media 47 años) y PM (edad media 54 años) se resumen en la Tabla 1. Seis pacientes, dos con DM y cuatro con PM, tenían una enfermedad pulmonar intersticial. De estos, los dos pacientes con DM y el paciente con PM tenían además anticuerpos anti-histidil-ARN de transferencia (anti-Jo-1). Los pacientes con MCI, cinco hombres y siete mujeres, tenían una edad media de 69 años, y ninguno recibía medicación inmunomoduladora. Los voluntarios sanos, en el momento de la incorporación, no habían tenido ninguna enfermedad grave en los últimos seis meses, no habían comenzado ninguna medicación nueva en los últimos seis meses y no habían tenido resfriado grave, gripe u otras infecciones en los dos meses previos. Los voluntarios estaban compuestos por cinco hombres y siete mujeres, y tenían una edad media de 46 años (intervalo 30-62 años). Un comité de ética interno aprobó el estudio. Se obtuvo un consentimiento informado por escrito de todos los pacientes y voluntarios sanos que participaron.

Valoración de la actividad de la enfermedad

Se clasificaron los pacientes con DM y PM como aquellos con enfermedad activa (DMA; PMA) y aquellos con enfermedad en mejoría (DMM; PMM). Los pacientes que cumplieron 3 de los 4 criterios siguientes se clasificaron como activos: (1) síntomas crecientes, (2) debilidad objetiva creciente en las pruebas musculares manuales, (3) creatina quinasa (CK) sérica elevada, y, si hubo disponible más de una medida, nivel creciente, y (4) el médico que aplicaba el tratamiento incrementó la inmunoterapia del paciente. Se han usado previamente características similares para definir la enfermedad activa en la miositis (Nagy, *et al.*, *Immunol. Lett.* 74(3):207-10 (2000)). Los pacientes con DM y PM se clasificaron como activos o en posible mejoría, antes del análisis de los datos de la expresión génica. Se usaron las pruebas musculares manuales con el uso de la escala MRC para valorar la fuerza; se calculó una puntuación compuesta para 30 grupos musculares diferentes, que proporcionó una puntuación máxima de 150. Se usó el índice de actividad de miositis por intención de tratar (MITAX) (Isenberg, *et al.*, *Rheumatology (Oxford)* 43(1):49-54 (2004)), propuesto por el Grupo Internacional de Evaluación y Estudios Clínicos sobre Miositis como medida adicional de la actividad de la enfermedad. El MITAX es una herramienta de evaluación multisistémica que examina los sistemas muscular, mucocutáneo, gastrointestinal, respiratorio y musculoesquelético. Se ha informado de una buena fiabilidad entre evaluadores para esta medida de la actividad de la enfermedad. En los nueve pacientes con muestras emparejadas se observó una reducción media de la puntuación MITAX de 8,5 entre los activos y en mejoría. Las puntuaciones de los activos oscilaron en 12-13 y las puntuaciones en mejoría oscilaron en 2-6.

Recogida de PBMC, recogida de tejido muscular, y extracción de ARN

Se recogieron 10 ml de sangre de los pacientes y voluntarios en tubos que contenían EDTA (57 muestras), o en algunos casos directamente en tubos PAX-Gene-RNA (8 muestras). Para los tubos que contenían EDTA, tras la centrifugación, se aspiró el plasma (capa superior) hasta 1 mm de los eritrocitos, y después se aspiraron cuidadosamente 500 µl de la capa leucocitaria en tubos de almacenamiento de criostato, ya rellenos de 1,2 ml de disolución RNAlater (Ambion, Austin, Texas). Se congeló la capa leucocitaria y RNAlater combinados a -20 °C. Se extrajo el ARN mediante el uso de "Ribo Pure" (Ambion, Austin, Texas) de la capa leucocitaria y de los tubos PAX-Gene-RNA. La concentración de ARN se midió mediante el uso de un espectrofotómetro, y se evaluó la calidad del ARN analizando 1 µg de ARN en geles de agarosa del 1%. Se extrajo el ARN de las muestras de biopsias musculares que pesaban de 70 a 120 mg como se describió previamente (Greenberg, *et al.*, *Neurology* 59(8):1170-82 (2002)). Se obtuvo tejido de biopsias musculares de 15 pacientes (5 DM, 5 PM, y 5 MCI) en el momento de enfermedad activa, todos los cuales también se sometieron a estudios en micromatrices para sangre en los momentos activos o en mejoría, y de 5 pacientes sin enfermedad neuromuscular que se sometieron a biopsias de diagnóstico. La extracción del ARN muscular se llevó a cabo con RiboPure de manera similar a la extracción de ARN de PBMCs. De estos 15 estudios con micromatrices para músculo con miopatía inflamatoria, 9 (3 con DM, 2 con PM y 4 con MCI) se llevaron a cabo previamente con parte de los datos usados en publicación, y se volvieron a analizar en este estudio, y 6 se llevaron a cabo de nuevo específicamente para estos estudios.

Preparación objetivo, hibridación y detección de señales

Se llevaron a cabo estudios con micromatrices para músculo como se describió previamente, mediante el uso de micromatrices HG-U133A de Affymetrix (Greenberg, *et al.*, *Neurology* 59(8):1170-82 (2002)). Las muestras de PBMC se procesaron mediante el uso de micromatrices HG-U133A Plus 2.0 de Affymetrix y el sistema operativo de GeneChip (GCOSv1.3) versión 1.3.

Procesamiento de datos

El GeneChip HG-U133 Plus 2.0 de Affymetrix tiene 54.675 grupos de sondas que incluyen 63 grupos de sondas de

control. Se obtuvieron anotaciones de los grupos de sondas de NetAffx Analysis Center, versión 3/9/2007. Los niveles de expresión se calcularon mediante el uso del análisis multichip robusto de contenido de GC (GCRMA), que se implementó en el paquete GCRMA de Bioconductor (disponible en <http://www.bioconductor.org/download/oldrelease/bioc1.6/popular/gcrma.html>). Este algoritmo produce una medida mejorada de la expresión teniendo en cuenta el sesgo basado en el contenido de GC y el comportamiento del ruido óptico de todas las matrices en un experimento (Wu, *et al.*, *J. Comput. Biol.* 12(6):882-93 (2005)). El control de calidad se llevó a cabo mediante inspección visual de imágenes escaneadas y reconstruidas para identificar artefactos macroscópicos y mediante evaluación cuidadosa de los parámetros de valoración de calidad, que incluyen los grupos de sondas de control. Todos los datos de las micromatrices para sangre y músculo se analizaron en conjunto con GCRMA en este estudio.

10 *Análisis y visualización de datos*

Se calculó la media y los intervalos de confianza (ICs) del 90% de los cambios proporcionales para cada grupo de enfermedad en comparación con el grupo control además del valor p de comparaciones de dos grupos mediante el uso de la prueba de Welch (Tabla 2). Se aplicaron criterios rigurosos para seleccionar los genes como estimulados de manera significativa, lo que requirió un valor $p < 0,0001$, y el límite inferior de ICs $> 4,0$. Los genes se identificaron como inducidos por IFN- α/β mediante búsquedas en la bibliografía (10-12) y bases de datos moleculares.

Los cambios proporcionales de los grupos y los ICs se calcularon comparando 8 DMA, 11 DMM, 7 PMA, 6 PMM, 13 MCI, 5 MG, 3 miopatías determinadas genéticamente, y 12 muestras de sangre normal. Además, 9 pacientes (7 con DM, 2 con PM) con muestras emparejadas (18 muestras) se analizaron por parejas para medir los cambios asociados al tratamiento en los distintivos génicos. Los datos de la expresión en sangre y músculo se compararon para 13.398 genes comunes a ambos chips de micromatrices HG-U133A y HG-U133A Plus 2.0 cartografiados según las identificaciones de los grupos de sondas de Affymetrix.

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

Se llevó a cabo la PCR cuantitativa en tiempo real para dos genes inducibles por IFN: IFIT1 y MX1 en 18 muestras (4 DMA, 5 DMM, 4 MCI, y 5 voluntarios sanos) mediante el uso de cebadores diseñados con el programa informático Primer (Whitehead Institute, Cambridge, MA) y adquiridos comercialmente (Operon Biotechnologies, Inc. Huntsville, AL). Los cebadores usados fueron los siguientes: MxA: directo 5'-CGGCTAACGGATAAGCAGAG-3' (SEQ ID N°:1), e inverso 5'-ACCTACAGCTGGCTCCTGAA-3' (SEQ ID N°:2; IFIT1: directo 5'-AAAAGCCCACATTTGAGGTG-3' (SEQ ID N°:3), e inverso 5'-GAAATTCCTGAAACCGACCA-3' (SEQ ID N°:4).

El ARN (1 μ g) se transcribió inversamente a cADN con oligo(dT)20 y el kit de transcripción inversa Ready-to-Go (Amersham Biosciences, Piscataway, Nueva Jersey). Se llevó a cabo una PCR en tiempo real basada en SYBR Green I con Opticon Monitor (MJ Research, Inc, Waltham, MA) con moldes de cADN (1/100 de la reacción RT) mediante el uso de taq polimerasa de Promega (Madison, WI) y tampón, $MgCl_2$ 2 mM, desoxi-NTP 400 mM (Roche), SYBR Green I 0,5X, 0,8 mM de cada cebador de PCR (Operon) en un volumen de reacción final de 25 ml. Las muestras se cargaron en pocillos de microplacas de 96 pocillos de perfil bajo. Tras una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, las condiciones de termociclado fueron 40 ciclos de desnaturalización (95 °C durante 30 s), hibridación (durante 30 s) y prolongación (72 °C durante 1 minuto). La señal de fluorescencia se midió inmediatamente después de la incubación a 79 °C durante 5 s después de cada etapa de prolongación, lo que eliminó la posible detección del dímero del cebador. Al final de los ciclos de PCR, se generó una curva de desnaturalización para confirmar la especificidad del producto de PCR. Para cada análisis, se usaron diluciones en serie de plásmidos de GAPDH humanos como patrones para la medida cuantitativa de la cantidad de cADN amplificado. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo por triplicado. Se usó un método CT comparativo para cuantificar los transcritos amplificados. Las proporciones medias de los transcritos amplificados se calcularon comparando DMM/DMA, DMA/Normal, DMM/Normal y MCI/Normal.

Inmunohistoquímica

Se tiñeron cortes musculares congelados de 15 pacientes (5 de cada uno de DM, PM, y MCI), cuyos músculos se sometieron a estudios en micromatrices, con anticuerpos contra la resistencia A a mixovirus (anticuerpos anti-MxA; cortesía del Dr. Otto Haller, Departamento de Virología, Universidad de Friburgo, Alemania) como se describió previamente (Greenberg, *et al.*, *Ann. Neurol.* 57(5):664-78 (2005)) y se examinaron para correlacionarlos con los estudios de transcritos.

50 Resultados

Los transcritos de genes inducibles por interferón- α/β en sangre son los más estimulados de todos los genes en PBMCs de pacientes con DM activa y en menor grado PM activa

Comparando los niveles de expresión de transcritos para DM activa (DMA) y PM activa (PMA) con los controles sanos, los genes inducidos por interferón- α/β tuvieron los cambios proporcionales más grandes y la significación estadística más elevada de los aproximadamente 38.500 transcritos medidos (valores $p < 0,0001$) (Tabla 2). De los 25 genes estimulados en mayor medida, se sabe que al menos 21 (84%) fueron inducibles por interferón- α/β . Ninguno de estos genes estuvo estimulado significativamente en los pacientes con MCI, MG o miopatías

determinadas genéticamente. La magnitud de la estimulación fue mayor en general en DM que en PM. Una RT-PCR cuantitativa mostró que los genes inducibles por interferón Mx1 e IFIT1 estuvieron sumamente estimulados en la sangre de DMA, lo que apoya las observaciones de los datos de las micromatrices (Tabla 3). El coeficiente medio de varianza de las muestras por triplicado fue 0,15, con una correlación elevada entre análisis por triplicado de 0,99. La correlación de los datos de RT-PCR con los datos de las micromatrices fue excelente (Mx1: $R^2 = 0,9889$; IFIT1: $R^2 = 0,9978$). En conjunto, 8 de 8 pacientes con DMA y 5 de 7 pacientes con PMA tuvieron niveles de sobreexpresión de genes inducibles por interferón- α/β que superaron los de las otras 50 muestras de sangre estudiadas.

Los genes inducibles por interferón- α/β se inhiben con la mejoría clínica en DM y PM

Se compararon los perfiles de los transcritos de 8 muestras de DMA con los de 11 de DMM, y por separado 7 muestras de PMA con 6 de PMM. Los genes más inhibidos con la mejoría de la enfermedad son predominantemente inducibles por interferón- α/β (Tabla 2, columnas de la derecha). Una RT-PCR cuantitativa confirmó de manera similar la mejoría en pacientes con DM (Tabla 3). En muestras emparejadas de los mismos pacientes con DM (N=6) o PM (N=2) que tuvieron enfermedad activa y en mejoría en dos momentos diferentes, los genes inducibles por interferón de tipo 1 fueron de nuevo los más inhibidos de todos los genes. Para el paciente con DM refractaria, se observó poco cambio global para muchos genes inducibles por interferón de tipo 1 en las muestras emparejadas.

La estimulación de genes inducibles por interferón- α/β es mayor en el músculo que en la sangre en DM, pero no en PM ni MCI

Para 15 pacientes (5 de cada uno de DM, PM y MCI), se compararon los perfiles de expresión génica en sangre con la expresión génica en músculo mediante el uso de los 13.398 genes que se comparten entre las micromatrices U133A (usada para realizar el perfil en músculo) y U133 Plus 2.0 (usada para realizar el perfil en sangre). En músculo de DM hay una estimulación notable de la expresión de los mismos genes inducibles por interferón- α/β que los que se descubrió que estuvieron sumamente estimulados en sangre. En contraste, en los músculos de PM y MCI, solamente hubo presente un incremento modesto de la transcripción de genes inducibles por interferón- α/β . Esto se puede haber debido a las células del sistema inmunitario infiltrantes que expresan genes inducibles por interferón- α/β , tales como MxA. De interés particular en DM, existe una sobreexpresión notable de ciertos genes inducibles por interferón en el músculo en comparación con la sangre. Por ejemplo, la expresión en músculo de DM de ISG15 fue aproximadamente 570 veces la del músculo normal, y alrededor de 100 veces mayor que en la sangre de DM.

La estimulación de la proteína MxA inducible por interferón- α/β se correlaciona con la patología tisular

Como se informó previamente, la sobreexpresión de una proteína génica inducible por interferón- α/β , MxA, está presente en el músculo en DM (Greenberg, *et al.*, *Ann. Neurol.* 57(5):664-78 (2005)). En el estudio actual, el nivel de transcrito de MxA, aunque estuvo elevado de manera similar en sangre de DMA (6,2 veces) y en sangre de PMA (6,0 veces), fue notablemente superior en estudios con micromatrices en músculo de DM (281 veces) en comparación con músculo de PM (2,5 veces). El enriquecimiento notable del transcrito de MxA en músculo de DM va acompañado de manera similar por un enriquecimiento notable de la proteína MxA mediante inmunohistoquímica en comparación con los cortes de músculo de DM y PM. En 4 de 5 pacientes con DM, la tinción de MxA estuvo presente intensamente en muchas miofibrillas, en particular miofibrillas perifasciculares, mientras que en los 5 pacientes con PM y los 5 con MCI, la tinción de MxA se limitó a las células del sistema inmunitario infiltrantes. La tinción de MxA no está presente en biopsias de músculo normal.

Discusión

Los hallazgos sugieren que, en la mayoría de los pacientes con DM y PM, pero no en los pacientes con MCI, existe un perfil diferente de expresión génica en sangre caracterizado por una sobreexpresión notable de genes inducibles por interferón- α/β . La mejora clínica durante el tratamiento inmunosupresor está asociada en general a la reducción de la sobreexpresión de estos genes hacia los niveles normales. Estos hallazgos, en relación con la expresión génica en el músculo, tienen implicaciones para las hipótesis patogénicas y los biomarcadores en sangre de uso diagnóstico potencial.

Para la dermatomiositis, el distintivo génico de interferón- α/β en la sangre está sumamente correlacionado con los hallazgos de los estudios con micromatrices en músculo, y apoya la hipótesis de que esta enfermedad puede estar controlada por la sobreproducción sistémica e intramuscular de interferón- α/β . Se ha informado de distintivos similares de la transcripción génica en sangre en el lupus eritematoso sistémico (LES) (Baechler, *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 100(5):2610-5 (2003); Bennett, *et al.*, *J. Exp. Med.* 197(6):711-23 (2003); Han, *et al.*, *Genes Immun.* 4(3):177-86 (2003)). La sobreexpresión a nivel de proteína para al menos uno de estos genes (MxA) está presente en los capilares y las miofibrillas perifasciculares del músculo de DM, y en la piel de DM (Wenzel, *et al.*, *Br. J. Dermatol.* 153(2):462-3 y 463-4 (2005); Wenzel, *et al.*, *Clin. Exp. Dermatol.* 31(4):576-82 (2006)). Además, las células dendríticas plasmocíticas (pDCs), células productoras de IFN- α naturales, son abundantes en el músculo de DM (Greenberg, *et al.*, *Ann. Neurol.* 57(5):664-78 (2005)) y en la piel (Wenzel, *et al.*, *Clin. Exp. Dermatol.* 31(4):576-82 (2006)). La estimulación de los niveles de transcritos de MxA en sangre se ha observado en DM juvenil, y se puede correlacionar con la actividad de la enfermedad (O'Connor, *et al.*, *Clin. Immunol.* 120(3):319-25 (2006)).

- Aunque los perfiles en sangre exhibieron niveles similares de sobreexpresión de genes inducibles por interferón- α/β en DM y PM, en el músculo algunos de estos genes se expresan de manera más elevada en varios órdenes de magnitud solamente en DM. Una explicación para esto podría ser que aunque la activación sistémica del sistema inmunitario innato está presente en ambas enfermedades, el músculo de DM está expuesto a una cantidad mayor de interferones de tipo 1 que el músculo de PM. Esta hipótesis está apoyada por los hallazgos previos de las células dendríticas plasmocitoides que segregan interferón- α/β que infiltran el músculo de DM (Greenberg, *et al.*, *Ann. Neurol.* 57(5):664-78 (2005)) en un número mucho mayor que el observado en MCI y PM (Greenberg, *et al.*, *Muscle Nerve* 35(1):17-23 (2007)). Además, mientras en PM la expresión de la proteína inducible por interferón- α/β MxA está limitada a las células inflamatorias invasoras, en DM la proteína MxA está presente en las miofibrillas.
- El enriquecimiento de tales genes inducibles por interferón- α/β específicos en el músculo es probablemente un indicio importante respecto a la naturaleza de la lesión tisular en DM. Así, el enriquecimiento notable del transcrito ISG15 en el músculo de DM sugiere que de las diversas proteínas inducibles por interferón- α/β estimuladas en la sangre y músculo de DM, esta molécula particular, un modificador similar a ubiquitina, podría tener una mayor importancia para los mecanismos directos de lesión tisular en DM.
- La ausencia evidente de genes de interferón- α/β sumamente estimulados en sangre de MCI, en comparación con la sangre de PM, contrasta con la naturaleza por otra parte similar de las anomalías inmunológicas que se han observado previamente en el músculo en estas dos enfermedades. Estos hallazgos sugieren una magnitud diferente de activación del sistema inmunitario innato en PM de la que ocurre en MCI. El estudio adicional de esta hipótesis se podría abordar mejor con un mayor número de pacientes. Además, para muchos pacientes, el diagnóstico de MCI se retrasa, y se reconoce solamente después de un diagnóstico previo de PM resistente a glucocorticoides (Amato, *et al.*, *Ann. Neurol.* 40(4):581-6 (1996)). Una caracterización adicional de los biomarcadores sanguíneos de genes inducibles por interferón- α/β en MCI y PM sugiere la posibilidad de un futuro diagnóstico más temprano de MCI y la eliminación del tratamiento con glucocorticoides para tales pacientes.
- Los hallazgos sugieren también la utilidad de los biomarcadores en sangre de la actividad de la enfermedad para complementar el tratamiento de los pacientes con DM y PM. En este estudio se han identificado múltiples biomarcadores en sangre de miositis activa sensible a la medicación. Actualmente existe la necesidad de ensayos más específicos para evaluar la actividad de la enfermedad en DM o PM. El nivel de creatina quinasa (CK) en suero es generalmente el reflejo de la actividad de la enfermedad en PM, pero puede ser normal en los pacientes con DM activa. Se ha propuesto el MITAX como medida clínica de la actividad de la enfermedad. Se calculó una puntuación MITAX para los pacientes con DM, que se correlacionó bien con la propia evaluación de la actividad de la enfermedad. Sin embargo, aunque se ha demostrado que MITAX es una buena herramienta para la valoración de la actividad de la enfermedad, la correlación entre clases entre evaluadores de la implicación muscular fue baja, lo que subraya la necesidad de una medida más objetiva (Isenberg, *et al.*, *Rheumatology (Oxford)* 43(1):49-54 (2004)). Un ensayo en sangre basado en PCR objetivo y barato que correlacionase la expresión de ciertos genes inducibles por interferón- α/β con la actividad de la enfermedad podría complementar el tratamiento clínico de DM y PM. Finalmente, tales ensayos podrían proporcionar marcadores sustitutos para la respuesta al tratamiento en ensayos clínicos.

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

Se estudiaron muestras de sangre emparejadas de los 9 pacientes marcados con un asterisco (*) para un total de 32 muestras de sangre de pacientes con DM y PM.

ID del Paciente / Enfermedad	E/S	AP	DE	Tratamiento (Tx)	Tx-E	CK	S	Puntuación de P.M.M.	X	Y	Z	Otros Diagnósticos
Dermatomiositis (DM) N=12												
BGE10-DMA*	38/M	No	108	Pred/IGIV	4	948	↑	142	↓	↑	12	-
BGE19-DMA*	61/M	Sí	12	Pred/Mico	24	165	↑	139	↓	↑	13	Ca. de mama
BGE46-DMA*	25/M	Sí	8	Pred	0,1	393	↑	128	↓	↑	12	-
BGE79-DMA*	46/M	No	72	Nada	0	740	↑	133	↓	↑	12	Calcinosis
BGE92-DMA*	27/M	Sí	17	Pred	11	1140	↑	146	↓	↑	13	EPI, Jo-1
BGE95-DMA*	53/H	Sí	25	MTX	23	6416	↑	131	↓	↑	13	Diabetes

ID del Paciente / Enfermedad	E/S	AP	DE	Tratamiento (Tx)	Tx-E	CK	S	Puntuación de P.M.M.	X	Y	Z	Otros Diagnósticos
Dermatomiositis (DM) N=12												
BGE99-DMA*	21/H	Sí	3	Nada	0	352	↑	148	↓	↑	12	-
BGE110-DMA	54/M	Sí	6	Pred	2	1140	↑	146	↓	↑	13	EPI, Jo-1
BGE15-DMI	62/M	Sí	36	Pred/Mico	12	80	↓	150	c	↓	2	
BGE17-DMI	70/M	No	24	Pred/IGIV/Mico	6	19	↓	123	↑	↓	2	-
BGE36-DMI	59/M	No	12	Pred/Mico	1	1652	↓	140	↓	↓	2	-
BGE80-DMI	44/M	No	1	Pred	1	71	↓	140	↓	↓	2	-
Polimiositis (PM) N=11												
BGE3-PMA	55/M	No	26	Pred/Mico	20	2100	↑	140	↓	↑	n.d.	-
BGE32-PMA	72/M	No	3	Pred/IGIV	2	1219	↑	100	↓	↑	n.d.	-
BGE47-PMA	72/M	No	11	Pred/Mico	9	3027	↑	118	↓	↑	n.d.	-
BGE98-PMA	38/M	No	16	Pred	16	129	↑	139,66	↓	↑	n.d.	EMTC
BGE106-PMA*	59/M	No	2	Nada	0	4720	↑	128,65	↓	↑	n.d.	-
BGE119-PMA*	47/M	No	5	Nada	0	1256	↑	135	↓	↑	n.d.	EPI/EMTC
BGE121-PMA	67/H	No	12	Nada	0	1102	↑	137	↓	↑	n.d.	EPI
BGE11-PMI	65/M	No	81	Aza/IGIV	48	472	↓	149	↑	↓	n.d.	EPI, Jo-1
BGE26-PMI	71/M	No	29	Pred/Aza/IGIV	29	29	↓	149	↑	↓	n.d.	EPI
BGE50-PMI	40/M	No	2	Pred/IGIV	2	663	↓	138	↑	↓	n.d.	-
BGE58-PMI	30/H	No	25	Pred/Mtx/IGIV	25	1743	↓	119	↑	↓	n.d.	-

E/S=Edad/sexo; AZA=azatioprina; CK=creatina quinasa; DE=Duración de la enfermedad; DMA=DM activa; DMM=DM en mejoría; DMS=DM sin miositis; c=completo; IGIV=inmunoglobulina intravenosa; EMTC=enfermedad mixta del tejido conectivo; EPI=enfermedad pulmonar intersticial; Meds=medicaciones; P.M.M.=prueba muscular manual; AP=atrofia perifascicular; Δ=cambio; PMA=PM activa; PMM=PM en mejoría; Pred=prednisona; Mico=micofenolato de mofetilo; MTX=metotrexato; S=síntomas; MITAX=Índice de actividad de miositis por intención de tratar; Tx-E=Duración de la enfermedad (meses); X=Δ de puntuación P.M.M.; Y=Δ Meds; Z=puntuación MITAX (DM solamente)

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

10 Los genes más expresados diferencialmente se enumeran en orden descendente de proporciones para DM activa (DMA) en comparación con los valores normales. Los símbolos de los genes inducibles por interferón-α/β bien establecidos están en negrita. La estimulación notable en DMA (N=8) también se observa en PM activa (PMA; N=7),

ES 2 567 094 T3

pero no en MCI activa (N=13), miastenia gravis (N=5), o miopatías genéticas (N=3), en comparación con los valores normales (Norm; N=12). Los criterios para la significación de los genes fue un valor $p < 0,0001$, con los 25 genes superiores enumerados ordenados por cambio de proporción (con intervalos de confianza). La comparación de los grupos de enfermedad en Mejoría respecto a Activa muestra una inhibición que se da con la mejoría relacionada con el tratamiento.

5

Símbolo del Gen	Título del Gen	Comparaciones de Grupos de Enfermedad						Comparación en Mejoría / Activa	
		A	B	C	D	E	F	G	H
IFI27	prt 27 inducible por interferón alfa	7,94 E-06	130 (28-277)	21,65	2,79	1,01	0,94	-2,34	1,31
IFI44L	prt 44 similar inducida por interferón	2,84 E-07	104 (39-194)	64,23	7,01	0,68	4,09	-9,65	-5,16
RSAD2	dominio del radical S-adenosilo/CIG5	2,20 E-07	66 (26-154)	42,04	4,63	1,09	2,98	-9,76	-6,00
IFI44	prt 44 inducida por interferón	1,61 E-06	57 (17-104)	27,28	2,94	0,52	1,46	-21,26	-7,11
LOC129607	prt hipotética LOC129607	4,74 E-09	47 (20-114)	29,34	3,48	1,20	2,51	-16,42	-5,68
OASI	2',5'-oligoadenilato sintetasa 1	3,80 E-09	36 (13-84)	15,13	2,05	0,35	1,04	-18,22	-3,90
EPSTI1	interacción 1 epitelial-estromal	4,27 E-07	33 (15-57)	16,24	3,09	0,73	3,50	-17,93	-2,21
BIRC4BP	factor 1 asociado a XIAP	7,99 E-06	24 (12-39)	17,38	4,18	0,78	1,76	-13,25	-3,45
IFIT5	tetratricopéptido 5 inducido por interferón	6,81 E-06	20 (10-32)	14,65	2,63	0,89	1,98	-13,24	-3,65
OASL	2',5'-oligoadenilato sintetasa similar;	3,23 E-08	19 (9-50)	9,49	2,42	0,38	0,84	-11,07	-3,92
OAS3	2',5'-oligoadenilato sintetasa 3	7,74 E-06	19 (8-34)	12,68	1,94	0,60	1,38	-13,18	-5,02
IFIT1	tetratricopéptido 1 inducido por interferón	2,87 E-06	18 (8-47)	15,50	1,92	0,37	1,45	-8,93	-7,83
PLSCR1	fosfolípido escramblasa 1	5,49 E-07	16 (9-25)	14,97	3,57	5,68	2,69	-4,19	-2,35
HERC5	dominio HECT y RLD 5	1,21 E-06	15 (5-30)	11,62	1,91	0,49	1,13	-13,58	-4,14
EIF2AK2	prt quinasa inducible por interferón	2,78 E-06	13 (7-24)	12,18	4,59	1,52	3,16	-6,23	-1,76
TNFSF10	superfamilia de TNF, miembro 10	6,42 E-05	13 (7-21)	10,79	3,58	2,69	3,26	-5,21	-2,56
GBP1	prt 1 de unión a guanilato	3,26 E-05	13 (6-21)	6,73	3,83	0,54	3,32	-9,79	-1,75
TNFAIP6	prt 6 inducida por TNF alfa	4,83 E-06	11 (6-17)	8,05	1,76	3,06	1,65	-4,44	-2,00
IFIT3	tetratricopéptido 3 inducido por interferón	5,46 E-08	9 (6-14)	7,41	1,84	0,59	1,82	-5,45	-2,95
SAMD9L	dominio 9 similar del motivo alfa estéril	1,59 E-05	9 (5-17)	13,96	7,58	0,39	2,10	-13,71	1,31
CHMP5	proteína 5 modificadora de cromatina	4,21 E-05	9 (5-13)	6,42	1,60	1,90	1,88	-4,21	-2,44

Símbolo del Gen	Título del Gen	Comparaciones de Grupos de Enfermedad						Comparación en Mejoría / Activa	
		A	B	C	D	E	F	G	H
ISG15	modificador similar a ubiquitina ISG15	5,24 E-05	9 (4-15)	4,86	1,04	0,19	0,55	-5,05	-4,62
OAS2	2',5'-oligoadenilato sintetasa 2	5,94 E-05	8 (4-14)	4,15	0,94	0,38	1,23	-9,74	-6,46
IFIH1	dominio 1 de helicasa C inducida por interferón	1,50 E-05	7 (4-10)	7,40	1,86	0,50	1,74	-8,09	-2,97
MX1	resistencia 1 a mixovirus	5,21 E-06	6 (3-13)	6,04	1,69	0,21	0,83	-4,54	-4,65

prt=proteína; A=valor p de DMA/norm; B=Proporción DMA/norm (intervalo de confianza); C=Proporción PMA/norm; D=Proporción MCI/norm; E=Proporción MG/norm; F=Proporción DYS/norm;

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

- 5 Los transcritos fueron de sangre de DM activa (DMA; N=4), DM en mejoría (DMM; N=5), MCI (N=4) y voluntarios sanos (N=5); se enumeran las proporciones. Los transcritos están aumentados en DM en comparación con los individuos normales y otras miopatías inflamatorias. La correlación de RT-PCR con los datos de las micromatrices fue excelente (Mx1: $R^2 = 0,9889$; IFIT1: $R^2 = 0,9978$).

Símbolo del Gen	DMM/DMA	DMA/Norm	DMM/Norm	MCI/Norm
IFIT1-matriz	-468	15,87	1,18	0,77
IFIT1-rtPCR	-9,31	55,55	5,97	1,77
Mx1-Matriz	-5,47	5,93	1,97	1,29
Mx1-rtPCR	-4,45	25,68	5,77	1,38

10 Tabla 4: Lista de Transcritos de ARN Génicos en Sangre

Genes identificados mediante el número de ID UniGene único del National Center for Bioinformatics, que representa todas las secuencias de la base de datos de GenBank; se proporciona un número de ID de GenBank único como ejemplo de una secuencia representativa.

Símbolo del Gen	Nombre del Gen	ID de UniGene	ID de GenBank
IFI27	proteína 27 inducible por interferón alfa	Hs.532634	BT006781.1
IFI44	proteína 44 inducida por interferón	Hs.82316	NM_006417.4
IFI44L	proteína 44 similar inducida por interferón	Hs.389724	NM_006820.2
CMPK2	Citidina monofosfato quinasa	Hs.7155	NM_207315.2
EIF2AK2	Proteína quinasa inducible por interferón	Hs.131431	AY302136.1
EPST11	interacción 1 epitelial-estromal	Hs.546467	AF396928.1
BIRC4BP	factor 1 asociado a XIAP	Hs.441975	BC058017.1
OAS1	2',5'-oligoadenilato sintetasa 1	Hs.524760	BT006785.1
OAS2	2'-5'-oligoadenilato sintetasa 2	Hs.414332	BC049215.1
OAS3	2'-5'-oligoadenilato sintetasa 3	Hs.528634	NM_006187.2
OASL	2'-5'-oligoadenilato sintetasa similar	Hs.118633	AJ225089.1
IFIT1	tetratricopéptido 1 inducido por interferón	Hs.20315	BT006667.1
IFIT2	tetratricopéptido 2 inducido por interferón	Hs.437609	AK312831.1
IFIT3	tetratricopéptido 3 inducido por interferón	Hs.714337	BT007284.1

ES 2 567 094 T3

IFIT5	tetratricopéptido 5 inducido por interferón	Hs.252839	NM_012420.1
PLSCR1	fosfolípido escramblasa 1	Hs.130759	AF098642.1
HERC5	dominio HECT y RLD 5	Hs.26663	AB027289.1
GBP1	proteína 1 de unión a guanilato	Hs.62661	BT006847.1
MX1	resistencia 1 a mixovirus	Hs.517307	M30817.1
RSAD2	dominio del radical S-adenosilo/CIG5	Hs.17518	BC017969.1
SAMD9L	Dominio 9 similar del motivo alfa estéril	Hs.489118	BC127118.1
TNFAIP6	proteína 6 inducida por TNF alfa	Hs.437322	NM_007115.2
TNFSF10	superfamilia de TNF, miembro 10	Hs.478275	NM_003810.2
CHMP5	proteína 5 modificadora de cromatina	Hs.635313	AF229832.1
ISG15	modificador similar a ubiquitina ISG15	Hs.458485	M13755.1
IFIH1	dominio 1 de helicasa C inducida por interferón	Hs.163173	BC046208.1

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> The Brigham and Women's Hospital, Inc.
 <120> Composiciones y métodos para diagnosticar y evaluar las miopatías inflamatorias
 <130> REP08655EP1
- 10 <150> EP 08780008.2
 <151>07-07- 2008
- <150> PCT/US2008/008333
 <151> 07-07-2008
- 15 <150> US 60/929,775
 <151> 12-07-2007
- <160> 4
- 20 <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
- <400> 1
 30 cggctaacgg ataagcagag 20
- <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
- 35 <400> 2
 acctacagct ggctcctgaa 20
- <210> 3
 40 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
- <400> 3
 45 aaaagcccac attgaggtg 20
- <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 50 <213> Homo sapiens
- <400> 4
 gaaattcctg aaaccgacca 20

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar si un sujeto exhibe un de patrón de expresión génica característico de dermatomiositis o polimiositis, y no característico de miositis por cuerpos de inclusión (MCI), que comprende:
 - 5 a) analizar una muestra biológica de ensayo de dicho sujeto que contiene células mononucleares de sangre periférica para medir la expresión del gen de la proteína 44 similar inducida por interferón (IFI44L);
 - b) llegar a la conclusión de que dicho sujeto tiene un perfil de expresión génica que es característico de dermatomiositis o polimiositis, y que no es característico de MCI, si los resultados determinados en el análisis indican que el gen IFI44L se expresa al menos 10 veces más en dicha muestra de ensayo que en una o más muestras de control.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica es una muestra de sangre, plasma o suero.
3. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho análisis se lleva a cabo mediante el uso de una placa de micromatriz.
4. El método de cualquier reivindicación precedente, que comprende además analizar la muestra de ensayo para medir la expresión de uno o más genes adicionales seleccionados del grupo que consiste en: dominio del radical S-adenosilo/CIG5, proteína 27 inducible por interferón alfa, proteína 44 inducida por interferón; proteína hipotética LOC129607; 2',5'-oligoadenilato sintetasa 1; factor 1 asociado a XIAP; tetratricopéptido 5 inducido por interferón; 2'-5'-oligoadenilato sintetasa similar; 2'-5'-oligoadenilato sintetasa 3; tetratricopéptido 1 inducido por interferón; fosfolípido escramblasa 1; dominio HECT y RLD 5; proteína quinasa inducible por interferón; miembro 10 de la superfamilia de TNF; proteína 1 de unión a guanilato; proteína 6 inducida por TNF-alfa; tetratricopéptido 3 inducido por interferón; dominio 9 similar del motivo alfa estéril; proteína 5 modificadora de cromatina; modificador similar a ubiquitina ISG15; 2'-5'-oligoadenilato sintetasa 2; dominio 1 de helicasa C inducida por interferón; resistencia 1 a mixovirus; y gen 1 de interacción epitelial-estromal.
- 15 5. El método de la reivindicación 4, en el que se analizan al menos 5 genes.
6. El método de la reivindicación 5, en el que se analizan al menos 15 genes.
- 25 7. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que el análisis se lleva a cabo mediante el uso de una placa de micromatriz que comprende una serie de oligonucleótidos inmovilizados diferentes, en el que:
 - a) dichos oligonucleótidos hibridan en condiciones rigurosas de manera específica con la secuencia génica del gen definido en la reivindicación 1;
 - 30 b) dichos oligonucleótidos están inmovilizados en una localización de dicha placa de micromatriz que no contiene ningún oligonucleótido que hibride con otras secuencias en condiciones rigurosas; y
 - c) dicha placa de micromatriz comprende no más de 100 oligonucleótidos diferentes inmovilizados en total.
8. El método de la reivindicación 7, en el que dicha placa de micromatriz comprende además oligonucleótidos que hibridan en condiciones rigurosas de manera específica con secuencias génicas de uno o más de radical S-adenosilo/CIG5, proteína 27 inducible por interferón alfa, proteína 44 inducida por interferón; proteína hipotética LOC129607; 2',5'-oligoadenilato sintetasa 1; factor 1 asociado a XIAP; tetratricopéptido 5 inducido por interferón; 2'-5'-oligoadenilato sintetasa similar; 2'-5'-oligoadenilato sintetasa 3; tetratricopéptido 1 inducido por interferón; fosfolípido escramblasa 1; dominio HECT y RLD 5; proteína quinasa inducible por interferón; miembro 10 de la superfamilia de TNF; proteína 1 de unión a guanilato; proteína 6 inducida por TNF-alfa; tetratricopéptido 3 inducido por interferón; dominio 9 similar del motivo alfa estéril; proteína 5 modificadora de cromatina; modificador similar a ubiquitina ISG15; 2'-5'-oligoadenilato sintetasa 2; dominio 1 de helicasa C inducida por interferón; resistencia 1 a mixovirus; y gen 1 de interacción epitelial-estromal.
- 35 9. El método de la reivindicación 8, en el que dicha placa de micromatriz comprende al menos 10 de los oligonucleótidos inmovilizados diferentes.
10. El método de la reivindicación 8, en el que dicha placa de micromatriz comprende al menos 15 de los oligonucleótidos inmovilizados diferentes.
- 45 11. El método de la reivindicación 8, en el que dicha placa de micromatriz comprende oligonucleótidos inmovilizados diferentes que hibridan en condiciones rigurosas de manera específica con la totalidad de dichos genes.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que dicha placa de micromatriz comprende no más de 50 oligonucleótidos inmovilizados diferentes en total.
- 50 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en el que dicha placa de micromatriz no comprende

oligonucleótidos inmovilizados diferentes que hibriden en condiciones rigurosas con un gen distinto de dicho gen.

14. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que si el resultado determinado en la etapa de análisis indica que el gen IFI44L se expresa al menos 20 veces más en dicha muestra de ensayo que en una o más muestras de control, se puede concluir que dicho sujeto tiene un perfil de expresión génica que es característico de dermatomiositis o polimiositis, y no es característico de MCI.

5