

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 994**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/564** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.01.2011 PCT/US2011/021992**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.07.2011 WO11091220**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2011 E 11735215 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2526422**

54 Título: **Método de diagnóstico de la enfermedad de Sjögren**

30 Prioridad:

**21.01.2010 US 297167 P**

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

**28.10.2016**

73 Titular/es:

**THE RESEARCH FOUNDATION OF STATE  
UNIVERSITY OF NEW YORK (100.0%)  
Stor Intellectual Property Division UB Technology  
Incubator Suite 111  
Amherst, NY 14228-2567, US**

72 Inventor/es:

**AMBRUS, JULIAN, L., JR. y  
SHEN, LONG**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 587 994 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método de diagnóstico de la enfermedad de Sjögren

Antecedentes de la invención

5 La enfermedad de Sjögren es un trastorno autoinmune común con una morbilidad y una mortalidad significativas que derivan en la destrucción de las glándulas salivares y lacrimales. Implica tanto autoinmunidad sistémica como local y en general se reconoce sólo después de que glándulas salivares y lacrimales se hayan destruido lo que da como resultado la boca seca y los ojos secos (Borchers, A. T., S. M. Naguwa, C. L. Keen, and M. E. Gershwin. 2003. Immunopathogenesis of Sjögren's syndrome. Clin Rev Allergy Immunol 25:89-104 ; Delaleu, N., R. Jonsson, and M. M. Koller. 2005. Sjögren's syndrome. Eur J Oral Sci 113:101-113). El síndrome de Sjögren es un síndrome común que afecta al 0,5 % de la población con un fuerte predominio del sexo femenino (Delaleu, N., R. Jonsson, and M. M. Koller. 2005. Sjögren's syndrome. Eur J Oral Sci 113:101-113, Fox, R. I. 2005. Sjögren's syndrome. Lancet 366:321-331). Se compone de xerostomía y xeroftalmía y puede ser debido a varias causas entre las que se incluyen envejecimiento, infecciones, medicamentos, toxinas ambientales y respuestas autoinmunes (Daniels, T. E. 2000. Evaluation, differential diagnosis, and treatment of xerostomia. J Rheumatol/Suppl 61:6-10). La enfermedad de Sjögren es un trastorno primario que consiste en el síndrome de Sjögren con manifestaciones sistémicas que incluyen linfadenopatía, neumonitis intersticial y enfermedad renal leve (Borchers, A. T., S. M. Naguwa, C. L. Keen, and M. E. Gershwin. 2003. Immunopathogenesis of Sjögren's syndrome. Clin Rev Allergy Immunol 25:89-104; Delaleu, N., R. Jonsson, and M. M. Koller. 2005. Sjögren's syndrome. Eur J Oral Sci 113:101-113). El síndrome de Sjögren es visto a menudo en asociación con otras enfermedades autoinmunes, especialmente lupus eritematoso sistémico (SLE) (Manoussakis, M. N., et al. Moutsopoulos. 2004. Sjögren's syndrome associated with systemic lupus erythematosus: clinical and laboratory profiles and comparison with primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 50:882-891). Los pacientes con enfermedad de Sjögren suelen tener hipergammaglobulinemia, y varios autoanticuerpos, especialmente Ro y La (Fox, R. I. 2005. Sjögren's syndrome. Lancet 366:321-331, Lazarus, M. N., and D. A. Isenberg. 2005. Development of additional autoimmune diseases in a population of patients with primary Sjögren's syndrome. Ann Rheum Dis 64:1062-1064, ansen, A., P. E. Lipsky, and T. Dorner. 2005. Immunopathogenesis of primary Sjögren's syndrome: implications for disease management and therapy. Curr Opin Rheumatol 17:558-565). Casi el 4 % de los pacientes con la enfermedad de Sjögren desarrollarán linfoma, predominantemente linfomas de no Hodgkin de células B.

30 El diagnóstico de la enfermedad de Sjögren se hace generalmente cuando los ojos secos causan irritación y abrasiones en la córnea, y la sequedad en la boca provoca dificultad para tragar y caries dental.

35 El diagnóstico bioquímico se basa en la detección de linfocitos infiltrándose en las glándulas salivales y de autoanticuerpos séricos que actúan en contra de Ro y La. Las terapias actuales implican el uso de lágrimas y saliva artificiales, así como fármacos colinérgicos para mejorar las secreciones de las pocas células glandulares restantes (la descripción de las tres siguientes citas se incorpora en el presente documento a modo de referencia: Kassan, SS, y H. M. Moutsopoulos 2004. Clinical manifestations and early diagnosis of Sjögren syndrome. Arch Intern Med 164:1275-1284, Latkany, R. 2008. Dry eyes: etiology and management. Current Opinion in Ophthalmology 19:287-291, Thanou-Stavraki, A., and J. A. James. 2008. Primary Sjögren's syndrome: Current and prospective therapies. Seminars in Arthritis and Rheumatism 37:273-292). Sin embargo, ninguna terapia actual restaura la función de las glándulas salivales y las glándulas lacrimales, porque las glándulas están destruidas en gran parte en el momento en el que se identifica la enfermedad. Por tanto, sería muy beneficioso poder diagnosticar la enfermedad de Sjögren de manera precoz ya que es cuando es susceptible de tratamiento, pero no existen tales métodos de diagnóstico. Por tanto, existe una necesidad permanente y no satisfecha de métodos mejorados para el diagnóstico de la enfermedad de Sjögren, y en particular para su uso en el diagnóstico antes de que las enfermedades avancen hasta un punto en el que los enfoques terapéuticos actuales sean inadecuados.

45 El documento US 2007/0184502 se refiere a un método para diagnosticar el síndrome de Sjögren, en el que la presencia y/o la cantidad de autoanticuerpos IgA contra  $\alpha$ -fodrina se determina en una muestra.

50 Ruan et. al. "The Autoimmune Regulator Directly Controls the Expression of Genes Critical for Thymic Epithelial Function" (J. Immunol., vol. 178, 2007, páginas 7173-7180) enseña que SP-1 y al menos otras ocho proteínas se expresan en menor grado en ratones que tienen una delección homocigótica de un gen regulador autoinmune (Aire) con respecto a ratones que son homocigotos normales para Aire.

El documento US 2007/184511 se refiere a un método para el diagnóstico de una persona con síndrome de Sjögren, comprendiendo el método el analizar muestras de fluido o tejido corporal con espectrometría de masas y comparar si la muestra del paciente contiene valores m/z que son característicos de la base de datos de referencia del síndrome de Sjögren.

55 Hu et. al. "Salivary Proteomic and Genomic Biomarkers for Primary Sjögren's Syndrome" (Arthritis & Rheumatism, vol. 56, nº 11, Noviembre 2007, páginas 3588-3600) se refiere a la identificación de biomarcadores de proteínas y de ARN mensajero en la saliva total humana.

El documento US 5895812 se refiere a nuevos polipéptidos que proporcionan secreción que mejora la actividad en el lagrimal y las células de la glándula parótida, anticuerpos monoclonales de los mismos, y métodos de diagnóstico del síndrome de Sjögren que utilizan los anticuerpos.

- 5 K. Bayetto y R.M. Logan "Sjögren's syndrome: a review of aetiology, pathogenesis, diagnosis and management" (Australian dental journal, vol. 55, 1 Junio 2010, páginas 39-47) ofrecen una revisión de las manifestaciones asociadas al síndrome de Sjögren y a los factores que tienen un papel en su etiología y patogénesis.

Breve descripción de la invención

10 La presente invención proporciona un método para determinar si un individuo humano tiene la enfermedad de Sjögren (SD). El método comprende determinar por una muestra biológica del individuo la presencia de anticuerpos que actúan en contra de la proteína de las glándulas salivales 1 (SP-1), la proteína secretora parótida (PSP) o la anhidrasa carbónica 6 (CA6), o determinar una combinación de los anticuerpos. Determinar que el individuo tiene SD en base a la presencia de los anticuerpos. También se proporciona un método para determinar que un individuo no tiene SD, que comprende determinar por una muestra biológica obtenida del individuo la ausencia de detección de anticuerpos contra PSP y SP-1 y determinar en base a la ausencia de detección de los anticuerpos que el individuo no tiene SD. El individuo también puede tener menos anticuerpos contra CA6 con respecto a un paciente que tiene SD. Puede utilizarse cualquier proteína PSP o CA6. Sin embargo, no hay homólogo humano conocido contra SP-1, y la invención proporciona en consecuencia un nuevo e inesperado descubrimiento de que los seres humanos con SD producen autoanticuerpos que reconocen SP-1 no humano, y en particular SP-1 murina. Se espera que la SP-1 producida en otros mamíferos no humanos también pueda ser utilizada para la detección de anticuerpos anti-SP-1.

El método de la invención se puede utilizar para diagnosticar SD en cualquier individuo de cualquier edad o sexo, y en cualquier etapa de la enfermedad. En una realización, la invención se utiliza para detectar SD precoz.

25 Los anticuerpos que están asociados positivamente a la SD y que se describen adicionalmente en este documento pueden detectarse usando cualquier método y/o reactivos adecuados para la detección de anticuerpos. En una realización, los anticuerpos se detectan utilizando un ensayo ELISA.

30 La invención también proporciona el uso de kits en el método de la invención que comprenden los antígenos a los que se dirigen los anticuerpos de pacientes con SD y pueden comprender además componentes para la recogida de muestras biológicas, reactivos para la detección de anticuerpos, reacción de control y otros materiales útiles para la detección de anticuerpos. En una realización, la invención proporciona el uso de un kit que comprende proteínas SP-1, PSP y CA6 purificadas o fragmentos de las mismas que son reconocidos por anticuerpos producidos por pacientes con SD. Las proteínas se pueden proporcionar de forma aislada y purificada, y pueden asociarse de manera covalente o no covalentemente a una matriz sólida.

Breve descripción de las figuras

35 La figura 1 proporciona una representación fotográfica de Western blot para autoanticuerpos en los sueros de ratones IL-14aTG durante las primeras etapas de la enfermedad de Sjögren. Para obtener los datos resumidos en la figura 1, se recogieron sueros de ratones IL-14aTG y ratones NOD y C57BL/6 a los 7 meses de edad. Se utilizaron la proteína de las glándulas salivales 1 (SP-1), la proteína secretora parótida (PSP) y la anhidrasa carbónica 6 (CA6) purificadas y expresadas de manera personalizada para ejecutar Western blots con estos sueros. Los datos mostrados son representativos de 6 ratones estudiados en cada grupo. El panel izquierdo muestra el suero de un ratón IL-14aTG que reconoce CA6 y PSP de manera clara y SP-1 de manera débil. El panel central muestra el mismo estudio con el suero de un ratón C57BL/6. Los sueros C57BL/6 no se adhirieron a ninguno de estos autoantígenos. El panel derecho muestra el mismo estudio con el suero de un ratón NOD. Tanto CA6 como PSP son reconocidas de manera clara por este suero.

45 La figura 2 proporciona una representación fotográfica de resultados de Western blots que demuestran que se encuentra linfotoxina en las secreciones de las glándulas salivales de ratones IL-14a Tg, aunque no de controles de compañeros de camada.

La figura 3 proporciona una representación gráfica de datos que muestran que se encuentra linfotoxina en los sueros de pacientes seleccionados con la enfermedad de Sjögren.

50 La figura 4 proporciona una representación fotográfica de Western blots que muestra autoanticuerpos en los sueros en las glándulas salivales de ratones IL-14aTG.LTA -/-. Los datos muestran que el suero de un ratón IL-14aTG.LTA -/- a los 11 meses de edad reacciona con CA6 y PSP.

La figura 5 proporciona una representación fotográfica de resultados de Western blots que muestra que los sueros de pacientes con la enfermedad de Sjögren contienen autoanticuerpos contra CA6, PSP y SP-1. Los Western blots se realizaron como en la figura 1 exceptuando que los sueros fueron utilizados a partir de pacientes con la

enfermedad de Sjögren o de controles normales por grupo de edad. Se evaluaron cinco pacientes y dos controles normales. Los datos mostrados son representativos de un paciente (los cinco pacientes mostraron resultados similares) y de un control normal (ambos controles normales mostraron resultados similares). Los pacientes con SD, aunque no los controles normales, tienen anticuerpos contra PSP y SP-1.

## 5 Descripción de la invención

La presente invención proporciona un método para determinar si un individuo humano tiene la enfermedad de Sjögren (SD). El método comprende determinar por una muestra biológica obtenida del individuo la presencia de anticuerpos contra la proteína de las glándulas salivales 1 (SP-1), la proteína secretora parótida (PSP) o la anhidrasa carbónica 6 (CA6), o determinar la presencia de una combinación de anticuerpos SP-1, PSP y CA6. Se determina que el individuo tiene SD si están presentes tales anticuerpos o combinaciones de los mismos.

La invención proporciona la primera identificación de una correlación positiva entre la SD y anticuerpos contra cualquiera de SP-1, PSP y CA6. Nuestro descubrimiento de que los pacientes humanos con SD producen anticuerpos que reconocen SP-1 murina era particularmente inesperado porque no hay ningún homólogo humano conocido de esta proteína. Por tanto, la invención proporciona un método sorprendente y novedoso para la identificación de individuos que tienen SD. La invención proporciona además la identificación de un individuo sin SD si los anticuerpos contra SP-1 y PSP no son detectados en una muestra biológica obtenida del individuo.

Además de los anticuerpos contra SP-1, PSP y CA6, se pueden determinar anticuerpos contra otros marcadores en el método de la invención para evaluar si una persona tiene o no tiene SD. Ejemplos no limitativos de tales anticuerpos incluyen los que actúan en contra de linfotóxina (LTA), mucina 10 (mucina de las glándulas salivales submandibulares), amilasa salival 1, Ro, La, receptor muscarínico 3, fodrina y las citoquinas IL-14 e interferón- $\alpha$ .

Nuestra demostración de que la producción de anticuerpos contra SP-1, PSP y CA6 son indicativos de SD se complementa con la investigación que realizamos en modelos de animales clínicamente relevantes de SD. En este sentido, hemos desarrollado un modelo de animal que reproduce todas las características inmunológicas y clínicas observadas en pacientes con SD en el mismo margen de tiempo relativo. El modelo de animal que hemos desarrollado se conoce como el ratón transgénico IL-14 $\alpha$  (IL14aTG). Utilizando este modelo, hemos demostrado que la infiltración linfocítica de las glándulas salivales se produce después de que las glándulas ya han sido destruidas y de que sólo un pequeño porcentaje de los ratones desarrollan anticuerpos contra Ro y La. Nuestros datos también demuestran que LTA es importante para una lesión temprana de las glándulas salivales en modelos de ratón IL14aTG y NOD de SD, y que los ratones IL-14aTG que carecen de LTA (IL-14aTG.LTA -/-) conservan la función normal de las glándulas salivales y no sufren ninguna infiltración linfocítica de sus glándulas salivales. También demostramos que LTA se encuentra en el suero de pacientes humanos con SD.

Los ratones IL-14aTG, al igual que los pacientes con SD, producen interferón- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) sistémicamente y linfotóxina (LTA) localmente en las glándulas salivales. Los autoanticuerpos se depositan en las glándulas salivales en el momento en el que se pierde la función de las glándulas salivales. Los autoantígenos reconocidos en esta etapa son diferentes de los autoantígenos observados más tarde en la enfermedad, Ro y La, que tradicionalmente han sido observados como característicos de SD. También hemos demostrado en este modelo que la función de las glándulas salivales se pierde antes de la infiltración de las glándulas salivales con linfocitos. En resumen, y sin la intención de estar limitados por ninguna teoría particular, se considera que los ratones IL-14aTG reproducen todas las características de SD observadas en pacientes en el mismo margen de tiempo relativo. Además, la SD se produce en todos los ratones IL-14aTG analizados. La evolución temporal de SD en ratones IL-14aTG es 1) producción de hipergammaglobulinemia y anticuerpos tempranos a los 6 meses de edad, 2) disminución de la función de las glándulas salivales con la infiltración linfocítica de sólo las glándulas submandibulares, aunque con deposición de anticuerpos en las glándulas submandibulares y parótidas a los 10 meses, 3) infiltración linfocítica de las glándulas submandibulares, parótidas y lacrimales con células B y T y células plasmáticas, junto con enfermedad renal y pulmonar leve a los 14 meses, y 4) linfoma de células grandes B a los 18 meses. Hay que tener en cuenta que la pérdida de función de las glándulas salivales se produce varios meses antes de la infiltración linfocítica de las glándulas salivales, lo que indica que hay lesión mediada por anticuerpos y/o citoquinas que se produce antes de la infiltración linfocítica de las glándulas. Además, como se señaló anteriormente, los ratones IL-14aTG generalmente no producen anticuerpos anti-Ro y anti-La durante las primeras etapas de la enfermedad. El patrón de inmunofluorescencia para la deposición de inmunoglobulina en las glándulas salivales varía con el tiempo, lo que sugiere que es probable que diferentes autoantígenos sean importantes en varias etapas de la enfermedad. Además, los ratones IL-14aTG no desarrollan diabetes, como los ratones NOD, o glomerulonefritis proliferativa, como los ratones (NZB x NZW) F1 y MRL/lpr. El ratón IL-14aTG es, pues, el único modelo de animal de SD que desarrolla todas las características de la enfermedad de Sjögren, en ausencia de otras enfermedades autoinmunes. De acuerdo con ello, los ratones IL-14aTG e IL-14aTG.LTA son valiosos para la identificación de episodios tempranos en el desarrollo de SD.

Identificamos los antígenos SD descritos en este documento, en parte, mediante el examen de la expresión de mRNA en el bazo de ratones IL14aTG. Hemos producido antígenos purificados codificados por estos mRNA y hemos demostrado que los modelos de ratón IL14aTG y NOD de SD desarrollan anticuerpos contra estos antígenos

durante el ciclo inicial de la enfermedad (Figura 1). También hemos demostrado que la linfotoxina está presente en las secreciones de las glándulas salivales de ratones IL14aTG durante el ciclo inicial de su enfermedad, y que la eliminación de la linfotoxina previene el desarrollo de lesiones de las glándulas salivales (Figura 2). Hemos demostrado que la linfotoxina está presente en los sueros de pacientes humanos con SD (Figura 3). Además, hemos demostrado la presencia de anticuerpos contra los antígenos de SD en ratones IL-14aTG.LTA -/- (Figura 4.) Más aún, también demostramos que los sueros de pacientes humanos con SD contienen autoanticuerpos contra CA6, PSP y SP-1 (la última de las cuales, como se describe más arriba, no tiene homólogo humano conocido), mientras que los controles normales no tienen anticuerpos contra PSP-1 o SP-1, y tienen únicamente una respuesta de anticuerpos débil contra CA6 (Figura 5). La respuesta de anticuerpos contra CA6 era más clara en pacientes con SD que en controles normales.

Cada uno de los marcadores de SD para el que están establecidos los anticuerpos de acuerdo con el método de la invención, está bien definido y se conoce de sobra en la técnica y sus secuencias de codificación y de aminoácidos están disponibles en el GenBank. Cada referencia de GenBank presentada en esta descripción se incorpora aquí como referencia en la fecha de esta invención. Se espera que cualquier antígeno CA6, PSP y SP-1 de mamífero (con la salvedad de que no se conoce ningún homólogo humano de SP-1) pueda ser utilizado con cualquiera de una amplia variedad de inmunoensayos establecidos en el método de la invención para determinar si un individuo produce o no anticuerpos que actúan en contra de los antígenos. En una realización, PSP murina se describe mediante las secuencias presentadas en la entrada de GenBank NM\_008.953.2. En una realización, SP-1 murina se describe mediante las secuencias presentadas en la entrada de GenBank NM\_009267.2. En una realización, CA6 se describe mediante las secuencias presentadas en la entrada de GenBank NM\_009802.2.

Los antígenos de proteínas que se utilizan para la detección de autoanticuerpos de acuerdo con el método de la invención se pueden preparar usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, cualquier secuencia de ADN que codifica los antígenos se puede hacer usando técnicas estándar e insertar en cualquier número de vectores de expresión. En la literatura, se han descrito vectores de expresión adecuados y muchos están disponibles comercialmente. Asimismo, una amplia variedad de sistemas de expresión son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente, incluidos los sistemas de procariotas y eucariotas. Las proteínas se pueden aislar de los sistemas de expresión o de cualquier otra fuente adecuada y purificar para usar en la invención en cualquier grado deseado de pureza.

La muestra biológica obtenida del individuo puede ser cualquier muestra biológica que comprenda anticuerpos, y puede comprender tejido biológico y/o líquido biológico. En varias realizaciones, el líquido biológico es sangre, suero o saliva.

Los autoanticuerpos que se correlacionan positivamente con la SD, como se describe en el presente documento, se pueden detectar usando cualquier técnica, dispositivo, sistema y/o reactivos adecuados, muchos de los cuales están disponibles comercialmente y/o son de otro modo bien conocidos por los expertos en la técnica. En varias realizaciones, técnicas de detección adecuadas incluyen, aunque no se limitan necesariamente a, técnicas inmunohistológicas, Western blot, placas de ensayo de pocillos múltiples adaptadas para la detección de los anticuerpos, microesferas adaptadas para la detección de los anticuerpos, un dispositivo o tira de flujo lateral que está adaptada para la detección de los anticuerpos, ensayos ELISA o cualquier modificación de un ensayo ELISA que sea adecuado para la detección de los anticuerpos. Además, cualquiera y todos los isotipos de los anticuerpos pueden ser detectados. Se considera que los primeros anticuerpos son todos o predominantemente IgM y los anticuerpos posteriores se componen de IgM e IgG. Por tanto, si se desea, la invención se puede adaptar para discriminar entre isotipos para ayudar a determinar, por ejemplo, la etapa de la enfermedad.

El método de la invención es adecuado para realizarlo en una muestra biológica obtenida de un individuo de cualquier edad o sexo. El método puede realizarse una vez, o se puede realizar una serie de pruebas, por ejemplo, para monitorizar la respuesta de un individuo a un tratamiento.

En una realización, la invención es adecuada para la determinación precoz de la SD. La SD precoz se considera que es una etapa de la SD antes de que disminuya la función de las glándulas salivales y/o lagrimales hasta un punto en el que los síntomas clínicos de la SD se ponen de manifiesto. Los expertos en la técnica serán capaces de reconocer la SD precoz, particularmente cuando se proporciona el beneficio de la presente descripción. Además, la invención proporciona en algunos individuos, tales como aquellos con otras enfermedades autoinmunes o un historial familiar de SD, pruebas para SD antes de que aparezca cualquier síntoma.

En una realización, la invención comprende fijar el resultado de realizar el método de la invención en un medio tangible de expresión, tal como un registro informático digitalizado. La invención comprende, además, comunicar el resultado de la realización del método de la invención a un profesional de la salud.

La invención también proporciona el uso de kits en el método de la invención que comprenden los antígenos a los que se dirigen los anticuerpos de pacientes con SD y pueden comprender además componentes para la recogida de muestras biológicas y reactivos para la detección de anticuerpos, controles positivos y similares. En una realización, la invención proporciona el uso de un kit que comprende proteínas SP-1, PSP y CA6 purificadas o fragmentos de las

mismas que son reconocidos por anticuerpos producidos por pacientes con SD. Los fragmentos de estas proteínas que pueden ser reconocidos por anticuerpos producidos por individuos que tienen SD se pueden determinar utilizando tareas rutinarias si se ofrece el beneficio de la presente descripción. En general, los fragmentos tendrán una longitud de 9 aminoácidos, hasta un aminoácido menor que la longitud total de las proteínas, e incluirán todos los números enteros de 9 aminoácidos hasta un aminoácido menor que la longitud total de las proteínas, inclusive. Por tanto, todos y cada uno de los fragmentos de estas proteínas se consideran parte de la presente descripción para su uso en la presente invención. Cada uno de estos fragmentos puede hacerse y probarse para determinar si los anticuerpos de los individuos que tienen SD reconocen los fragmentos. Las proteínas o fragmentos de las mismas se pueden proporcionar de forma aislada y purificada y pueden asociarse a una matriz sólida. La matriz sólida puede estar presente como un componente de cualquier sistema que pueda utilizarse para la detección de anticuerpos, tales como placas de ensayo de múltiples pocillos, microesferas, dispositivos o tiras de flujo lateral o cualquier otra forma o formato que sea adecuado para mantener las proteínas en una posición en la que los anticuerpos puedan adherirse a ellos y ser detectados en el método de la invención. Las proteínas pueden estar asociadas de manera covalente o no covalentemente a la matriz sólida.

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar ciertas realizaciones de la invención, aunque no pretenden limitar la invención.

#### **Ejemplo 1**

Este ejemplo demuestra la producción de autoanticuerpos en el suero de modelos de ratón SD en las primeras etapas de SD.

Con el fin de obtener los resultados presentados en la figura 1, se recogieron sueros de ratones IL-14aTG, NOD y ratones C57BL/6 a los 7 meses de edad. Expresamos y purificamos SP-1, PSP y CA6 y utilizamos las proteínas purificadas para el análisis Western blot. Los datos mostrados son representativos de 6 ratones estudiados en cada grupo. El panel izquierdo muestra el suero de un ratón IL-14aTG que reconoce CA6 y PSP de manera clara y SP-1 de manera débil. El panel central muestra el mismo estudio con el suero de un ratón C57BL/6. Ninguno de estos autoantígenos se adhirió mediante sueros C57BL/6. El panel derecho muestra el mismo estudio con el suero de un ratón NOD. Tanto CA6 como PSP son reconocidas de manera clara por este suero.

#### **Ejemplo 2**

Este ejemplo demuestra que LTA se encuentra en las secreciones de las glándulas salivales de ratones IL-14aTG pero no en controles de compañeros de camada. Con el fin de obtener los resultados de los datos presentados en la figura 2, se recogieron secreciones de las glándulas salivales de ratones IL-14a TG y de varios ratones de control a los 12 meses de edad. Se realizaron ensayos Western blot en especímenes no diluidos. Las pistas 1 y 2 son de ratones IL-14a TG, las pistas 3 y 4 son de ratones IL-14aTG. LTA -/-, las pistas 5 y 6 de ratones LTA -/- y las pistas 7 y 8 de ratones C57BL/6. También analizamos la histología de las glándulas parótidas y submandibulares en ratones IL-14aTG.LTA -/-. Estas son normales.

#### **Ejemplo 3**

Este ejemplo demuestra que LTA se encuentra en los sueros de pacientes humanos con SD. Con el fin de obtener los resultados que se presentan en la figura 3, se obtuvieron sueros de 6 donantes normales (la edad y el sexo coincidían con los de los 6 pacientes con enfermedad de Sjögren) y 12 pacientes con enfermedad de Sjögren. Se determinaron los niveles de linfotoxina mediante un ELISA disponible comercialmente (R & D Systems, Inc). La diferencia entre los niveles séricos de linfotoxina entre controles normales y pacientes con la enfermedad de Sjögren fue estadísticamente significativa ( $p = 0,0011$ ).

#### **Ejemplo 4**

Este ejemplo demuestra la identificación de autoanticuerpos en los sueros y las glándulas salivales de ratones IL-14aTG.LTA -/-. Los datos presentados en la figura 4 muestran que el suero de un ratón IL-14aTG.LTA -/- a los 11 meses de edad reacciona con SP-1, CA6 y PSP. El Western blot se realizó como se indica en la figura 1.

#### **Ejemplo 5**

Este ejemplo demuestra que el suero obtenido de pacientes humanos con SD contiene anticuerpos contra CA6 murina, PSP murina y SP-1 murina. Se realizaron Western blots básicamente como se describe para la figura 1, excepto que se utilizaron sueros de pacientes con SD o de controles normales con la misma edad. Se evaluaron cinco pacientes y dos controles normales. Los datos mostrados son representativos de un paciente (los cinco pacientes mostraron resultados similares) y de un control normal (ambos controles normales mostraron resultados similares). Los pacientes con SD aunque no controles normales tienen anticuerpos contra PSP y SP-1. La respuesta de anticuerpos contra CA6 era más clara en pacientes con SD que en controles normales. Por tanto, hemos

demostrado que la presencia de anticuerpos contra CA6, PSP y CA6 se puede utilizar para diagnosticar SD en seres humanos.

**REIVINDICACIONES**

1. Método para determinar si un individuo humano tiene la enfermedad de Sjögren (SD) que comprende
  - i) determinar por una muestra biológica del individuo la presencia de anticuerpos que actúan en contra de cualquiera de las siguientes, proteína de las glándulas salivales 1 (SP-1), proteína secretora parótida (PSP) o anhidrasa carbónica 6 (CA6), o determinar la presencia de una combinación de dichos anticuerpos, y determinar que el individuo tiene SD en base a la presencia de los anticuerpos; o
- 5 determinar por una muestra biológica obtenida del individuo la ausencia de detección de anticuerpos contra PSP y SP-1 y determinar en base a la ausencia de detección de los anticuerpos que el individuo no tiene SD.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la combinación de los anticuerpos incluye anticuerpos contra SP-1.
- 10 3. Método según la reivindicación 1, en el que el individuo tiene SD precoz.
4. Método según la reivindicación 1, en el que la determinación de los anticuerpos se lleva a cabo mediante ensayo ELISA.
5. Método según la reivindicación 4, en el que los anticuerpos en la muestra biológica que actúan en contra de SP-1 se adhieren/bind a SP-1 murina en el ensayo ELISA.
- 15 6. Método según la reivindicación 1, en el que el individuo que no tiene SD tiene una menor cantidad de anticuerpos contra CA6 que un individuo que tiene SD.
7. Método según la reivindicación 1, que comprende además determinar la presencia o ausencia de autoanticuerpos contra cualquiera de los siguientes, linfotoxina (LTA), mucina 10 (mucina de las glándulas salivales submandibulares), amilasa salival 1, Ro, La, receptor muscarínico 3, fodrina, IL-14, interferón- $\alpha$ , o combinaciones de los anteriores.
- 20 8. Uso en el método según la reivindicación 1 de un kit que comprende proteína de las glándulas salivales 1 (SP-1) o un fragmento de la misma que es reconocido por anticuerpos de un individuo con la enfermedad de Sjögren (SD), proteína secretora parótida (PSP) o un fragmento de la misma que es reconocido por anticuerpos de un individuo con SD, anhidrasa carbónica 6 (CA6) o un fragmento de la misma que es reconocido por anticuerpos de un individuo con SD, o combinaciones de los anteriores.
- 25 9. Uso según la reivindicación 8, en el que dicha SP-1 o un fragmento de la misma que es reconocido por anticuerpos de un individuo con SD, dicha PSP o fragmento de la misma que es reconocido por anticuerpos de un individuo con SD, y dicha CA6 o un fragmento de la misma que es reconocido por anticuerpos de un individuo con SD están asociados a una matriz sólida.
- 30 10. Uso según la reivindicación 9, en el que la matriz sólida se selecciona a partir de placas de ensayo de múltiples pocillos, microesferas y dispositivos o tiras de flujo lateral.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dichos fragmentos que son reconocidos por anticuerpos de un individuo con SD tienen una longitud que tiene 9 aminoácidos hasta un aminoácido menor que la longitud total de las proteínas.
- 35 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que los anticuerpos contra la proteína de las glándulas salivales 1 (SP-1) reconocen SP-1 murina.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la muestra biológica es un líquido biológico seleccionado de sangre, suero y saliva.
- 40 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la determinación de los anticuerpos se lleva a cabo mediante una técnica seleccionada de técnicas inmunohistológicas, de Western Blot, de placas de ensayo de múltiples pocillos adaptadas para la detección de los anticuerpos, de microesferas adaptadas para la detección de los anticuerpos, de un dispositivo o tira de flujo lateral que está adaptada para la detección de los anticuerpos y de ensayos ELISA.



Figura 1

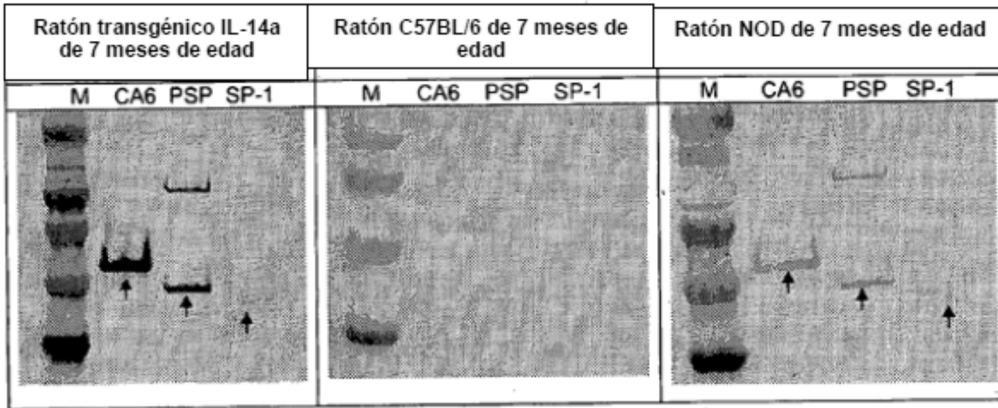


Figura 2

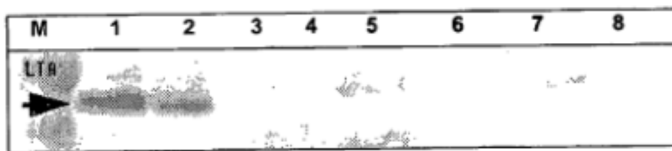


Figura 3

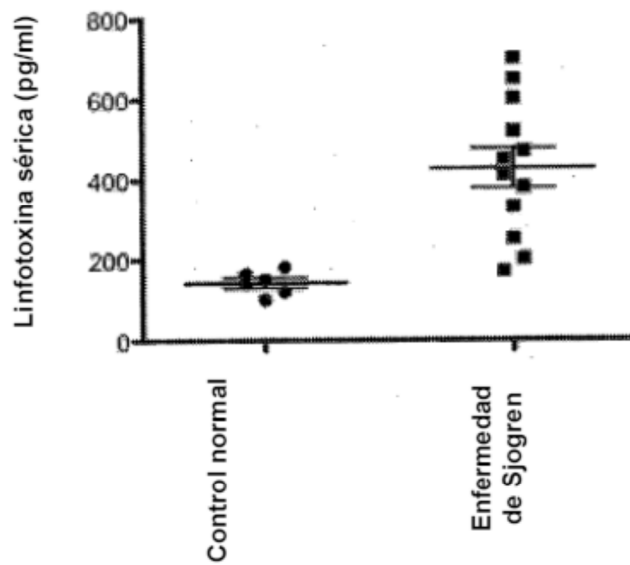


Figura 4

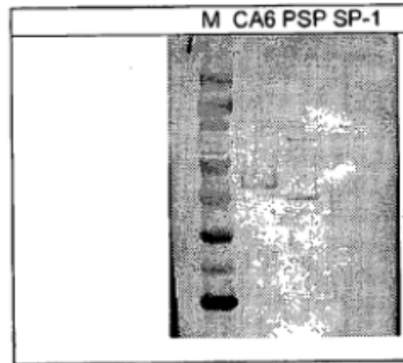


Figura 5

	Marcador	CA6	PSP	SP-1
<b>Paciente con la enfermedad de Sjogren</b>				
<b>Control normal</b>				