

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 723**

21 Número de solicitud: 201630620

51 Int. Cl.:

G01N 33/53

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

12.05.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.11.2017

71 Solicitantes:

SERVIZO GALEGO DE SAÚDE (SERGAS) (40.0%)
Edificio Administrativo de San Lázaro. c/ San
Lázaro, s/n
15703 Santiago de Compostela (A Coruña) ES y
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (60.0%)

72 Inventor/es:

PEGO REIGOSA, José María;
CORDERO SANTAMARÍA, Óscar y
VARELA CALVIÑO, Rubén

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **Uso de los niveles de anticuerpos anti-CD26 como biomarcadores de enfermedades autoinmunes y/o inflamatorias.**

57 Resumen:

La presente invención se refiere al uso de anticuerpos anti-CD26 como marcadores para el screening (cribado), el diagnóstico o la monitorización de los sujetos con sospecha de tener una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria, como la artritis reumatoide, en particular aquellos en una etapa temprana de la enfermedad. Más específicamente, se refiere a un método in vitro para el cribado de un sujeto que se sospecha que tiene una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria y comprende los siguientes pasos:

a) la determinación de los niveles de anticuerpos IgG anti-CD26 en una muestra del paciente que contiene los anticuerpos.

b) comparar los niveles en esa muestra que contiene anticuerpos con un valor de referencia, de manera que un aumento de los niveles de anticuerpos IgG anti-CD26 en la muestra objeto con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de la enfermedad y en el que dicho valor de referencia corresponde a los niveles medios de anticuerpos IgG anti-CD26 IgG en sujetos sanos.

ES 2 642 723 A1

DESCRIPCIÓN

USO DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS ANTI-CD26 COMO BIOMARCADORES DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES Y/O INFLAMATORIAS

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención puede ser incluida en el campo de la medicina personalizada, en la que biomarcadores específicos se utilizan para el cribado (screening), el diagnóstico, el pronóstico, la predicción de los resultados del tratamiento, y/o seguimiento de cierta enfermedad o trastorno. Específicamente, los anticuerpos anti-CD26 se utilizan en la presente invención como marcadores para el cribado (screening), el diagnóstico o el seguimiento de
- 10 los sujetos humanos que tienen, o se sospecha que tienen, una enfermedad autoinmune y/o enfermedad inflamatoria, tal como la artritis reumatoide, y en particular aquellos en una etapa temprana de la enfermedad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 La Artritis Reumatoide (AR) se considera una enfermedad autoinmune e inflamatoria. Es la forma más común de enfermedad inflamatoria crónica de las articulaciones y afecta al 1-2% de la población general. La enfermedad se caracteriza por la inflamación de las articulaciones, dolor articular, y la destrucción de las articulaciones sinoviales, lo que lleva a una discapacidad severa y mortalidad prematura.

- 20 El uso óptimo de Fármacos Antirreumáticos Modificadores de la Enfermedad (FARME), como metotrexato, y la incorporación en el esquema terapéutico de AR de nuevos agentes biológicos en los últimos diez años ha aumentado drásticamente el éxito en la gestión de la AR. A este respecto, hay un creciente número de evidencias que indican que la destrucción
- 25 de las articulaciones y el declive funcional (discapacidad) en la AR se mejoran mediante la intervención terapéutica temprana y agresiva. El tratamiento de los pacientes en una etapa en la que la evolución de la destrucción articular todavía se puede prevenir sería lo ideal, por lo tanto la necesidad de un diagnóstico precoz inequívoco se ha vuelto crítica (Aletaha D et al, Arthritis Rheum 2010, 62: 2569-2581).

- 30 El diagnóstico de la AR todavía se basa en parámetros clínicos específicos, tales como el número de articulaciones afectadas o duración de los síntomas. Sin embargo, la presentación clínica precoz de la AR es inicialmente indistinguible de otras formas de artritis (Rooy DP et al, Rheumatology 2011, 50:93-100).

- 35 Analitos o biomarcadores tales como la velocidad de sedimentación globular (VSG), Proteína C-Reactiva (CRP) niveles de concentración), Factor Reumatoide (EP0175270) y anticuerpos

anti-MBL (Mannose Binding Lectin) (Gupta B et al, J Autoimmun 2006,,27: 125-133, Afzal N et al, Clin Lab 2011, 57: 895-899, Takizawa Y et al, Ann Rheum Dis 2006, 65: 1013-1020, Vossenaar ER et al, Arthritis Res Ther 2004, 6: R142-R150) se han utilizado con valor diagnóstico limitado. Las pruebas actuales para el seguimiento de la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento de la AR también tienen limitaciones de sensibilidad (González-Quintela A et al, Clin Exp Immunol 2007, 151: 42-50).

Se ha visto que antígenos como la vimentina citrulinada, colágeno de tipo II, fibrinógeno y la alfa enolasa producen altos niveles de autoanticuerpos (ACPA) que aparecen en el suero de los pacientes con enfermedad establecida (Ohmura K et al, Rheumatology 2010, 49: 2298-2304, Vossenaar ER et al, Arthritis Res Ther 2004, 6: 107-111). Estos anticuerpos frente a péptidos/proteínas citrulinadas (ACPA) no sólo son altamente específicos para la AR, sino que también aparecen de manera temprana en el proceso de la enfermedad cuando el diagnóstico es más difícil y la intervención más eficaz. Sin embargo, existe un subconjunto de la población negativo para este biomarcador, alrededor de 1/4 (Aletaha D et al, Arthritis Rheum 2010, 62: 2569-2581). En concreto, la sensibilidad de estos anticuerpos es del 80% en pacientes con AR establecida, del 55% en AR temprana y del 40% en AR muy temprana (Nicaise Roland P et al, Arthritis Res Ther 2008; 10 (6): R142, Ohmura K et al, Rheumatology 2010, 49: 2298-2304).

Las recientes investigaciones sobre los ACPA están revelando información acerca de la especificidad de los antígenos que inician o perpetúan reacciones inflamatorias autoinmunes antes de la aparición de la enfermedad. Por ejemplo, se han descrito las modificaciones post-traduccionales de las proteínas propias que participan en romper la tolerancia de células T y B (Reynisdóttir G et al, Arthritis Rheum 2014, 66: 31-9). También se ha visto que la inmunidad a ACPA comienza fuera de las articulaciones, siendo los pulmones, los ganglios linfáticos y el tejido gingival los tejidos identificados en los que se inicia la patogénesis de la AR (Catrina AI et al, Nat Rev Rheumatol 2014, 10: 645-53; Demoruelle MK et al, Curr Opin Rheumatol 2014, 26: 64-71).

Ha sido descrito que los niveles de ACPA son más altos en el líquido sinovial en comparación con el suero, lo que demuestra ya una manifestación sinovial dominante (Aletaha D et al Arthritis Rheum 2010, 62: 2569-2581, Snir O et al, Arthritis Rheum 2010, 62: 44 -52). En este contexto, los investigadores ahora están buscando autoantígenos con títulos elevados de autoanticuerpos preferentemente en el suero en un intento de acercarse más a la patogénesis de la AR y obtener herramientas para el diagnóstico precoz (Reynisdóttir G et al,

Arthritis Rheum, 2014 66: 31-9, Catrina AI et al, Nat Rev Rheumatol 2014, 10: 645-53, Snir O et al, 2010 Arthritis Rheum 62, 44-52, Trouw LA et al, Autoimmun Rev 2012, 12: 318-22.

La dipeptidil peptidasa IV humana (DPP-IV / CD26), una glicoproteína de membrana de tipo II con actividad intrínseca DPP-IV, es una molécula clave en la regulación inmune y las enfermedades autoinmunes (Hosono et al, Modern Rheumatology 2003, 13, 199-204). Se ha descrito que DPP IV purificada a partir de suero humano, carece del dominio transmembrana de la enzima unida a la membrana (Iwaki-Egawa S et al, Jap J Biochem 1998; 124: 428-33), sin embargo no se ve afectada su actividad enzimática ni su capacidad de unión a la adenosina deaminasa (ADA).

La actividad DPP-IV es un factor que contribuye a la patogénesis de la artritis reumatoide (Busso N et al, Am J Pathol 2005, 166: 433-42, Sedo A et al, Arthritis Res Ther 2005, 7: 253-69). Como resultado de su actividad de escisión de dipéptidos N-terminales X-Pro, puede regular las respuestas quimiotácticas a varias quimiocinas inflamatorias, incluyendo SDF-1, a varios péptidos biológicamente activos, tales como NPY y VIP, recientemente implicados en la AR, además de ser un quimorepelente de neutrófilos (Herlihy SE et al, Arthritis Rheumatol 2015, 67:2634-8, Cordero OJ et al, PLoS One 2015, 10: e0131992).

Varios autores, entre ellos los inventores, (Cordero OJ et al, PLoS One 2015, 10:e0131992, Cordero OJ et al, Rheumatol Int 2001, 21: 69-74, Muscat C et al, Clin Exp Immunol 1994, 98: 252-6, Ellingsen T et al, Scand J Immunol 2007, 66: 451-7) han observado niveles reducidos de sCD26 y de la actividad DPP-IV en los pacientes con AR y han encontrado correlaciones importantes entre la expresión de CD26 en algunos subtipos de células T con la actividad de la enfermedad (en forma del indicador DAS28) y los niveles séricos de sCD26 (Cordero et al, PLoS One 2015, 10: e0131992).

Barr et al predijeron la existencia de autoanticuerpos contra DPP-IV sérica humana (sCD26) (Barr VA et al 1995. J Biol Chem. 270: 27834-44), que fueron descritos por primera vez por Cuchacovich et al (Clin Exp Rheumatol 2001, 19: 673-80). Cuchacovich et al determinaron los niveles séricos medios de DPP-IV, la actividad específica de la DPP-IV y los niveles de anticuerpos anti-CD26 de los isotipos IgG, IgM e IgA en pacientes que sufrían enfermedades autoinmunes e inflamatorias, concretamente, en AR, Lupus Eritematoso Sistémico (SLE) y Síndrome de Sjögren primario (SS). Encontraron que los niveles en suero de DPP IV de pacientes con AR fueron similares a los de los controles normales; sin embargo, se redujeron en el suero de pacientes con SLE y SS cuando se comparan con los controles normales. Curiosamente, mientras que la concentración de DPP IV en el suero de pacientes con AR

parecía normal, su actividad específica se redujo significativamente. Además, se investigó si los anticuerpos anti-DPP IV pueden modificar la actividad de la enzima. Los resultados mostraron que los niveles de suero de autoanticuerpos anti-DPP IV de la clase IgA fueron significativamente mayores en los sueros de AR, SLE y pacientes con SS cuando se comparan con los de los controles normales. Los niveles séricos de autoanticuerpos anti-DPP IV de las clases IgG e IgM en los tres grupos de pacientes resultaron no ser significativamente diferentes de los de los controles normales, con lo cual Cuchacovich et al llegaron a la conclusión de que sólo los autoanticuerpos anti-DPP IV de la clase IgA pueden tener alguna relevancia en la respuesta inmune frente a DPP IV.

US2006/0177886 se refiere a un método para el diagnóstico de la AR que comprende medir la actividad de DPP-IV en una muestra biológica obtenida de un mamífero. En particular, se reportó un aumento estadísticamente significativo (alrededor de 5 veces superior) de la actividad de DPP-IV en pacientes con AR con respecto a pacientes con osteoartritis (OA). No se observó una correlación entre la actividad de la DPP-IV en la AR y la gravedad de la enfermedad.

La detección y el diagnóstico temprano de AR se ha asociado con un resultado más positivo de la terapia y es vital para establecer un correcto tratamiento basado en la evidencia, de acuerdo con el estado de progresión de la enfermedad. Desde la perspectiva del médico, una detección temprana, un diagnóstico preciso y una clasificación de la enfermedad en función de su grado de desarrollo tendría beneficios potenciales con respecto a la orientación a los pacientes, la valoración del pronóstico de la enfermedad, el seguimiento y la progresión de las recaídas de la enfermedad, y en particular con la elección del tratamiento más adecuado. A pesar de los progresos significativos que se han realizado en los últimos años en el descubrimiento de marcadores moleculares y serológicos relacionados con la AR, existe una continua necesidad de métodos mejorados para la detección temprana, el diagnóstico preciso, clasificación, estudio de la progresión y/o pronóstico de la AR y autoinmunes y enfermedades inflamatorias relacionadas.

RESUMEN DE LA INVENCION

Los niveles de IgA, IgM e IgG anti-CD26 se midieron en una cohorte de pacientes con AR que estaban sometidos a diferentes terapias biológicas y no biológicas (**Ejemplo 3**), y para la cual la actividad de la enfermedad fue evaluada previamente por los inventores como se publicó en Cordero OJ et al, 2015. En los nuevos datos generados, niveles más altos de auto-anticuerpo (Ab) anti-CD26, alrededor de dos veces para cada isotipo, fueron encontrados en dicha cohorte con respecto a los donantes sanos, mientras que los cocientes con los

respectivos títulos de Ig Total eran diferentes para cada isotipo. Más específicamente, se encontró que niveles de IgA, IgM e IgG anti-CD26 y cocientes anti-CD26/total de anticuerpos de isotipo IgG, eran estadísticamente significativamente diferentes en comparación con donantes sanos (**Ejemplo 3.1**).

5

Basándose en este hallazgo, se determinó el valor discriminatorio de anticuerpos anti-CD26 entre los pacientes con AR (sometidos a diferentes terapias) y donantes sanos en toda la cohorte, donde los títulos de IgG mostró una sensibilidad del 82% y una especificidad del 96% con los puntos de corte seleccionados (ver **Ejemplo 4.1**).

10

Además, el valor de detección/diagnóstico fue probado en el grupo sometido a FARME pero sin terapia biológica (noBT), que se parecería más a un grupo de pacientes diagnosticados y/o pacientes más cerca de pre-AR, en el sentido de que estas terapias no cambian la expresión de CD26. Se encontró una sensibilidad del 77% para el isotipo anti-CD26 IgG y una sensibilidad de 73% para el anti-CD26 IgM (**Ejemplo 4.2**). Sólo 2 de los 22 pacientes fueron negativos para los tres isotipos. Estos resultados apuntan a la utilidad de estos marcadores en la detección o diagnóstico de la AR.

15

Además, se encontraron correlaciones de los niveles de anti-CD26 con parámetros de actividad de la enfermedad (**Ejemplo 6**), en particular los anticuerpos anti-CD26 de los tres isotipos se correlacionan negativamente con el Contaje de Articulaciones inflamadas (TJC en inglés), lo que sugiere una relación específica de estos auto-anticuerpos con las articulaciones.

20

Así, de acuerdo con estos particulares hallazgos, la presente invención proporciona en un primer aspecto un método *in vitro* para el cribado de un sujeto que tiene, o se sospecha que tiene una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria que comprende los siguientes pasos:

25

- a) la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgG y/o anti-CD26 IgM en una muestra aislada de dicho sujeto que contiene el anticuerpos;
- b) comparar los niveles en dicha muestra que contiene anticuerpos con un valor de referencia.

30

En un aspecto relacionado, la invención se refiere a un método *in vitro* para la obtención de datos útiles para el diagnóstico de una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas a) y b) del primer aspecto.

35

En un aspecto relacionado más extenso, la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas a) y b) del primer aspecto.

- 5 En un aspecto relacionado adicional, la invención se refiere a un método *in vitro* para la clasificación de los sujetos como i) sujetos sanos o como ii) sujetos que tienen, o se sospecha que tienen una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria, comprendiendo dicho método las etapas a) y b) del primer aspecto.
- 10 En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* de control de la enfermedad y/o seguimiento de la capacidad de respuesta a un tratamiento en un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria, comprendiendo dicho método los pasos de a) y b) del primer aspecto de la invención.
- 15 En un aspecto relacionado, la invención se refiere a un método *in vitro* para la clasificación de un sujeto como respondedor a un tratamiento para una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria, comprendiendo dicho método las etapas a) y b) del primer aspecto de la invención.
- 20 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria, comprendiendo dicho método la identificación del sujeto a ser tratado por un método que comprende las etapas a) y b) del primer aspecto de la invención
y
- 25 c) el tratamiento de dicho sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad autoinmune y / o enfermedad inflamatoria.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar la etapa de progresión de una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria en un sujeto, comprendiendo
30 dicho método las etapas a) y b) del primer aspecto de la invención.

En un aspecto relacionado, la invención se refiere a un método *in vitro* de determinación de un tratamiento para un sujeto que tiene una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria de acuerdo con su etapa de progresión que comprende las etapas a) y b) del primer aspecto de
35 la invención.

En un aspecto relacionado, la invención se refiere al uso de los niveles determinados *in vitro* de anti-CD26 IgG y/o anti-CD26 IgM y/o los niveles de anti-CD26 de IgG de anticuerpos / los niveles totales de IgG, opcionalmente en combinación con los niveles de anticuerpos anti-CD26 de IgA determinados *in vitro*, en una muestra, aislada de un sujeto, que contiene anticuerpo para la detección, diagnóstico y/o seguimiento de una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria; y/o para controlar la eficacia de un tratamiento en una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit que comprende los reactivos para la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26-del isotipo IgG en una muestra que contiene anticuerpo, aislada de un sujeto, en el que dicho kit comprende:

- a) un reactivo para determinar los niveles de anticuerpos anti-CD26 del isotipo IgG;
- b) opcionalmente, instrucciones para el uso de dicho reactivo en la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 del isotipo IgG en una muestra, aislada de dicho sujeto, que contiene anticuerpo.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende los reactivos para la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 del isotipo IgM en una muestra que contiene anticuerpo aislado de un sujeto, en el que dicho kit comprende:

- a) un reactivo para determinar los niveles de anticuerpos anti-CD26 del isotipo IgM;
- b) opcionalmente, instrucciones para el uso de dicho reactivo en la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 del isotipo IgM en una muestra, que contiene anticuerpo, aislada de dicho sujeto.

Todavía en un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un kit del aspecto precedente para la detección, diagnóstico y/o seguimiento de una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria; y/o para el seguimiento de la eficacia de un tratamiento en una muestra, que contiene anticuerpo, aislada de un sujeto.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método *in vitro* para la detección, obtención de datos útiles para el diagnóstico, diagnóstico o seguimiento de un sujeto que padece, o se sospecha que padece una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria que comprende los siguientes pasos:

- a) la determinación de los niveles de anticuerpos totales del isotipo IgA (niveles totales de anticuerpos IgA) en una muestra, que contiene anticuerpos, aislada de dicho sujeto;
- b) comparar los niveles en dicha muestra que contiene anticuerpos con un valor de referencia.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria, comprendiendo dicho método la identificación del sujeto a ser tratado por un método que comprende las etapas de:

- 5 a) la determinación de los niveles de anticuerpos totales del isotipo IgA (niveles totales de anticuerpos IgA) en una muestra, que contiene anticuerpos, aislada de dicho sujeto;
- b) comparar los niveles en dicha muestra que contiene el anticuerpos con un valor de referencia;
- y
- 10 c) el tratamiento de dicho sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad autoinmune y / o enfermedad inflamatoria.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit que comprende los reactivos para la determinación de los niveles totales de anticuerpos de isotipo IgA en una muestra, que

- 15 contiene anticuerpos, aislada de un sujeto, en el que dicho kit comprende:
- a) un reactivo para determinar los niveles de anticuerpos totales del isotipo IgA;
- b) opcionalmente, instrucciones para el uso de dicho reactivo en la determinación de los niveles totales de anticuerpos de IgA en una muestra, que contiene anticuerpos, aislada de dicho sujeto.

20 Todavía en un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un kit para la detección, diagnóstico y/o seguimiento de una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria; y/o para el seguimiento de la eficacia de un tratamiento en una muestra, que contiene anticuerpo, aislada de un sujeto, en el que dicho kit comprende reactivos para la determinación de los

25 niveles de anticuerpos IgA totales según los kits descritos en el aspecto anterior.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Valores de corte de los niveles de los anticuerpos anti-CD26/DPP-IV y frecuencia de los valores anómalos en los pacientes con AR del grupo noBT (pacientes bajo FAME) y los

30 donantes sanos (DS) o donantes control. Se muestran los niveles de IgM **(A)**, IgG **(B)** y IgA **(C)** en ambos grupos. Valores de corte (20, 2.85 y 1.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente).

Fig. 2. Las correlaciones entre los parámetros de actividad de la enfermedad de AR y los niveles de autoanticuerpos anti-CD26 IgA/DPP-IV en el grupo anti-TNF. En **(A)** correlaciones

35 del isotipo IgA con el TJC (contajes de articulaciones inflamadas); en **(B)** correlaciones del isotipo IgA con la puntuación DAS28.

Fig. 3. Las correlaciones entre los parámetros de actividad de la enfermedad AR y los títulos de autoanticuerpos de anti-CD26 IgG/DPP-IV en el grupo anti-CD20. En **(A)** correlaciones del isotipo IgG con el TJC; en **(B)** con el SJC (articulaciones dañadas); en **(C)** con las correlaciones DAS28 del isotipo IgA con la puntuación DAS28; y en **(D)** con la PGA (componente subjetivo del DAS28).

Fig. 4. Los autoanticuerpos anti-CD26 / DPP-IV no son ACPA. En **(A)** los sobrenadantes recuperados de la prueba ACPA después de la incubación de suero de 3 donantes sanos (DS) y pacientes fueron utilizados a continuación para la prueba de anti-CD26. Se observaron los mismos valores de absorbancia cuando se utilizaron muestras de suero directamente en esta prueba anti-CD26 (no mostrados). En **(B)**, las barras en gris oscuro muestra los valores de absorbancia del test ACPA realizado en el suero de los mismos individuos (un control fue también positivo) y las barras en gris claro muestran los valores de absorbancia de los test ACPA llevados a cabo en los sobrenadantes recuperados del test anti-CD26 de los mismos individuos; se observaron diferencias en un paciente con AR (3º) y en un donante sano (1º). Los valores de ruido de fondo ya fueron extraídos de los datos de absorbancia mostrados.

Fig. 5. Se muestran las correlaciones entre los niveles de autoanticuerpos anti-CD26 / DPP-IV y los niveles de Ig totales de los tres isotipos (A, G o M), o sus ratios (auto-anticuerpos / Ig total) con la concentración sérica de sCD26 y la actividad enzimática de DPP-IV en la cohorte de pacientes con AR en diferentes terapias. **(A)** Los pacientes bajo FAME (sin terapia BT), **(B)**, **(C)** y **(D)** pacientes bajo terapia biológica (BT): anti-TNF, anti-CD20 y anti-IL6R / Ig-CTLA4, respectivamente. sCD26 se refiere a la concentración de DPP-IV. Los números representan el coeficiente de Pearson, r, los asteriscos son para la significación estadística, * p <0.05, ** p <0.005). Sólo en el grupo anti-TNF hubo algunas coincidencias.

Fig. 6. Los efectos de los tratamientos sobre los niveles de anticuerpos se observan en los ratios entre los isotipos Ig A, G o M. Las columnas 1-4 se refieren a muestras de pacientes que han recibido FAME; anti-TNF-; anti-CD20; y anti-IL6R / Ig-CTLA4 respectivamente. En muchos casos, los efectos sobre los ratios de los isotipos de autoanticuerpos (fila inferior) eran lo opuesto a lo observado en los coeficientes de los isotipos de anticuerpos totales (fila superior), demostrando la especificidad de los anti-autoanticuerpos anti-CD26.

Fig. 7. Curva ROC (Característica Operativa del Receptor) para anti-CD26 IgM en toda la cohorte. Área bajo la curva (AUC) = 0.748, el eje X representa 1 - especificidad y el eje Y representa la sensibilidad.

Fig. 8. Curva ROC para anti-CD26 IgG en toda la cohorte. Área bajo la curva (AUC) = 0.881, el eje X representa 1 - especificidad y el eje Y representa la sensibilidad.

Fig. 9. Curva ROC para anti-CD26 de IgA en toda la cohorte. Área bajo la curva (AUC) = 0.661, el eje X representa 1 – especificidad y el eje Y representa la sensibilidad.

Fig. 10. Curva ROC para anti-CD26 IgG / IgG total en toda la cohorte. Área bajo la curva (AUC) = 0.741, el eje X representa 1 – especificidad y el eje Y representa la sensibilidad.

Fig. 11. Curva ROC para anti-CD26 IgM en pacientes sometidos a FAME pero sin terapia biológica. Área bajo la curva (AUC) = 0.751, el eje X representa 1 - especificidad y el eje Y representa la sensibilidad.

Fig. 12. Curva ROC para anti-CD26 de IgG en pacientes sometidos a FAME pero sin terapia biológica. Área bajo la curva (AUC) = 0.846, el eje X representa 1 – especificidad y el eje Y representa la sensibilidad.

Fig. 13. Curva ROC para anti-CD26 de IgA en pacientes sometidos a FAME pero sin terapia biológica. Área bajo la curva (AUC) = 0.672, eje X 1 - especificidad, eje Y sensibilidad.

Fig. 14. Curva ROC para anti-CD26 IgG / IgG total en pacientes sometidos a FAME pero sin terapia biológica. Área bajo la curva (AUC) = 0.804, eje X 1 - especificidad, eje Y sensibilidad.

Fig. 15. Curva ROC para IgA total en toda la cohorte. Área bajo la curva (AUC) = 0.979, eje X 1 - especificidad, eje Y sensibilidad.

Fig. 16. Curva ROC para el total de IgA en pacientes sometidos a FAME pero no a terapia biológica. Área bajo la curva (AUC) = 0.94, el eje X representa 1 – especificidad y el eje Y representa la sensibilidad.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

El término " el cribado" (en inglés "screening") se entiende aquí como el examen o análisis de un grupo de individuos asintomáticos pertenecientes a la población en general, o un grupo de

individuos sospechosos de padecer una enfermedad, con el objetivo de discriminar individuos sanos de aquellos que tienen o se sospecha que tiene una enfermedad.

5 El término "sujeto que tiene una enfermedad", como se usa en el presente documento, se refiere a aquellos sujetos diagnosticados para una enfermedad dada. El término "diagnóstico" tal como se utiliza aquí se refiere a determinar la presencia o ausencia de una enfermedad en un sujeto sospechoso de tener la enfermedad. Una "prueba de diagnóstico" se podría utilizar para sugerir o descartar la enfermedad.

10 El término "sujeto sospechoso de tener una enfermedad", como se usa aquí, se refiere a un sujeto que presenta uno o más signos o síntomas indicativos de dicha enfermedad. Un sujeto que se sospecha que tiene una enfermedad también puede tener uno o más factores de riesgo (es decir, un sujeto que puede desarrollar o está en riesgo de desarrollar una enfermedad). Abarca, además, un individuo que ha recibido un diagnóstico preliminar, pero
15 para los que una prueba de confirmación no se ha hecho. Además, se incluye a aquellos individuos en remisión.

El término "sujeto" como se usa aquí, se refiere a un sujeto mamífero. Preferiblemente, se selecciona de un ser humano, los animales de compañía, animales de granja no domésticos
20 o de los animales del zoo. Por ejemplo, el sujeto seleccionado puede ser un ser humano, perro, gato, vaca, cerdo, oveja, caballo, oso, y así sucesivamente. En una realización preferida, dicho sujeto mamífero es un sujeto humano.

El término "enfermedad reumática inflamatoria" tal como se utiliza aquí se refiere a una
25 enfermedad del aparato locomotor y/o de los tejidos conectivos en la que los mecanismos inflamatorios juegan un papel relevante. Una enfermedad reumática puede afectar a las articulaciones, huesos, cartílagos, tendones, ligamentos y músculos.

El término "fase de progresión" de una enfermedad reumática inflamatoria puede referirse a
30 una etapa de progresión de la enfermedad en la que no hay daños irreversibles (por ejemplo, no hay daños irreversibles en las articulaciones).

El término "artritis reumatoide temprana", "AR temprana" o "eRA", como se usa en el presente documento puede referirse a un sujeto diagnosticado con Artritis Reumatoide,
35 típicamente con duración de los síntomas de ≤ 6 meses que no ha recibido ningún tratamiento de primera línea para el tratamiento de AR (es decir, corticosteroide o terapia

FAME) y cuyo radiografías de las manos y los pies convencional no mostraron daño estructural.

El término "artritis reumatoide muy temprano" o "veRA" como se usa en el presente documento puede referirse a un sujeto diagnosticado con AR temprana con duración de los síntomas de ≤ 3 meses. Más detalles sobre la clasificación de los pacientes con AR se proporcionan en los criterios de clasificación del ACR / EULAR (Ann Rheum Dis 2010; 69: 1580-1588).

El término "control" (también referido como "seguimiento" o "monitorización") de la enfermedad", como se usa aquí se refiere a la determinación de la evolución de la enfermedad, por ejemplo determinar si existe una remisión de la enfermedad, es decir, una reducción de los signos y/o síntomas que caracterizan la enfermedad clínica; o por el contrario si existe progresión de la enfermedad o una recaída.

El término "respuesta a un tratamiento" como se usa aquí, se refiere al grado en el que un tratamiento logra los resultados deseados o previstos, por ejemplo, la capacidad de un fármaco para conseguir el efecto profiláctico y/o terapéutico deseado.

El término "tratamiento" abarca tanto un tratamiento profiláctico o terapéutico. El término "tratamiento terapéutico" o "terapia" tal como se utiliza aquí se refiere a llevar un cuerpo de un estado patológico o enfermedad a su estado normal y saludable. El término "tratamiento profiláctico" tal como se utiliza aquí se refiere a la prevención de un estado patológico.

El término "muestra que contiene anticuerpo" o "muestra biológica que contiene anticuerpo" como se usa aquí incluye fluidos biológicos, tales como sangre entera, suero, plasma, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, lavado bronquial, fluido de ascitis, aspirado de médula ósea, derrame pleural, orina, así como cualquier tejido o cualquier otro constituyente corporal que podrían contener anticuerpos o células que expresan los mismos. Las células que expresan y secretan anticuerpos (células B) están presentes en, y en su caso se pueden aislar de diferentes tejidos, órganos y fluidos biológicos de individuos. Las células B se pueden encontrar en los órganos centrales o primarios linfoides que generan linfocitos de células progenitoras inmaduras, tales como el timo y la médula ósea. Alternativamente, las células B se pueden encontrar en el tejido linfóide secundario que proporciona el ambiente para que el antígeno interactúe con los linfocitos, como son los ganglios linfáticos, los folículos linfoides en las amígdalas, placas de Peyer, el bazo, el adenoides, la piel, etc. Que están asociados con el tejido linfóide asociado a la mucosa. Se observa que las células mononucleares en el

bazo contienen un mayor porcentaje de células secretoras de IgG. Las células B se pueden encontrar en los fluidos biológicos tales como sangre, cefalorraquídeo, sinovial o fluidos pleurales. Alternativamente, los linfocitos también se pueden encontrar en los sitios de infección crónica y/o inflamación.

5

El término "valor de referencia" como se usa en el presente documento se refiere a un valor determinado en una o más muestras, en general, los valores medios de, preferiblemente, un número estadísticamente significativo de muestras, obtenido de una población de referencia o control. La determinación del "valor de referencia" se lleva a cabo en condiciones similares o idénticas como la muestra biológica del sujeto a prueba. Típicamente, dichas muestras de referencia son del mismo tipo de tejido o célula y se han sometido a los mismos procedimientos para su obtención y preservación. Alternativamente, dichos "valores de referencia" son valores preestablecidos, en general, los valores medios, en la población de control o de referencia.

15

El término "kit" o "kit de prueba" se refiere a combinaciones de reactivos y aditivos necesarios para un análisis. Aunque un kit de prueba suele constar en la mayoría de los casos de varias unidades, los elementos de análisis de una sola pieza también son válidos y también debe ser considerado como kits de prueba.

20

El término "parcialmente idéntico" tal como se utiliza aquí se refiere a una secuencia que es al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96% , al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% idéntica a una secuencia de referencia. En algunas realizaciones, la secuencia parcialmente idéntica puede ser sustancialmente idéntica a una secuencia de referencia, que es al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% idéntica a dicha secuencia de referencia. En una realización, la secuencia parcialmente idéntica es 100% idéntica a una secuencia de referencia.

30

El término "identidad" como se utiliza aquí se refiere a una correspondencia exacta nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de dos polinucleótidos o secuencias de polipéptidos, respectivamente. Dos o más secuencias (polinucleótido o aminoácidos) pueden compararse determinando su "porcentaje de identidad". El "porcentaje de identidad" de dos secuencias, ya sean secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos, es el número de coincidencias

35

exactas entre dos secuencias alineadas dividido por la longitud de la secuencia más corta y multiplicado por 100. Los programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias son bien conocidos en la técnica, tales como el programa BLAST del NCBI, que se utiliza por ejemplo, con los parámetros por defecto (<http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>).

El término "Curvas Características del Receptor (ROC)" tal como se utiliza aquí se refiere a una representación gráfica que ilustra el funcionamiento de un sistema clasificador binario en el que la movilidad del valor umbral a considerar se puede variar. La curva se crea mediante el trazado de la tasa de verdaderos positivos frente a la tasa de falsos positivos en varios ajustes de umbral. La tasa de verdaderos positivos también se conoce como sensibilidad. La tasa de falsos positivos se calcula como 1 - especificidad. La curva ROC es por tanto una manera de mostrar gráficamente la verdadera tasa positiva frente a la tasa de falsos positivos (sensibilidad frente a (1-especificidad)) a través de una gama de valores de corte y de seleccionar el punto de corte óptimo para el uso clínico. La precisión que se expresa como el área bajo la curva ROC (AUC) proporciona un parámetro útil para comparar el rendimiento del ensayo. Si AUC se aproxima a 1 indica que la prueba es muy sensible así como altamente específica, mientras que una AUC que se acerca 0.5 indica que la prueba no es sensible ni específica. En general, una prueba se considera que es un discriminador adecuado si el AUC es 0.6 a 0.75, para tener una alta capacidad de discriminación si el AUC es 0.75 a 0.9 y para ser una excelente discriminador si el AUC es de 0.9 a 1. Para más detalles, véase por ejemplo, Zweig MH y Campbell G, Clin Chem 1993; 39: 561-577, o Greiner et al, Prev Vet Medicine 2000; 45: 23-41.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Un método in vitro para el cribado de un sujeto que tiene, o es sospechoso de tener una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria y los métodos relacionados con los mismos

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el cribado de un sujeto que tiene, o se sospecha que tiene una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria que comprende los siguientes pasos:

- a) la determinación de los niveles de anti-CD26 IgG y/o anticuerpos anti-CD26 IgM en una muestra aislada de dicho sujeto que contiene anticuerpos.
- b) comparar los niveles en dicha muestra que contiene anticuerpos con un valor de referencia.

En un aspecto relacionado, la invención se refiere a un método *in vitro* para la obtención de datos útiles para el diagnóstico de una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas a) y b) del primer aspecto.

- 5 En un aspecto relacionado adicional, la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas a) y b) del primer aspecto.

- 10 En un aspecto relacionado adicional, la invención se refiere a un método *in vitro* para la clasificación de los sujetos como i) sujetos sanos o como ii) sujetos que tienen, o se sospecha que tienen una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria, comprendiendo dicho método las etapas a) y b) del primer aspecto.

- 15 El primer aspecto y los aspectos relacionados descritos anteriormente en el presente documento pueden ser referidos colectivamente como primer aspecto de la invención.

- El término "enfermedad inflamatoria" se entiende cualquier enfermedad en la que hay una respuesta inflamatoria excesiva o alterada que conduce a los síntomas inflamatorios. Dichas enfermedades inflamatorias incluyen, sin limitación, enfermedad de Addison, acné vulgar, alopecia areata, amiloidosis, ulceraciones, estomatitis aftosa, arteriosclerosis, artritis, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, asma bronquial, Enfermedad de Bechet, Enfermedad de Boeck, Enfermedad Inflamatoria Intestinal, Enfermedad de Crohn, coroiditis, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, crioglobulinemia, degeneración macular, dermatitis, dermatitis herpetiforme, dermatomiositis, diabetes dependiente de insulina, diabetes juvenil, enfermedad desmielinizante inflamatoria, contractura de Dupuytren, encefalomiелitis, encefalomiелitis alérgica, endophthalmia, alérgica enteritis, síndrome de enteropatía autoinmune, eritema nudoso leproso, la parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, fibrosis quística, gingivitis, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, síndrome de Graves, enfermedad de Hashimoto, hepatitis crónica, histiocitosis, ileitis regional, iritis, lupus eritematoso diseminado, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso cutáneo, linfogranuloma, mononucleosis infecciosa, miastenia gravis, mielitis transversa, mixedema idiopático primario, nefrosis, obesidad, oftalmía simpática, orquitis granulomatosa, pancreatitis, paniculitis, pénfigo vulgar, periodontitis, poliarteritis nodosa, poliartritis crónica, polimiositis, polirradiculitis aguda, psoriasis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, púrpura, pioderma gangrenoso, Síndrome de Reiter, retinopatía diabética, la rosácea, sarcoidosis, esclerosis atáxica, esclerosis sistémica progresiva, escleritis, esclerodermia, esclerosis múltiple, esclerosis

diseminada, uveítis anterior aguda, vitíligo, enfermedad de Whipple, y enfermedades asociadas al SIDA, inmunodeficiencia combinada grave y/ el virus de Epstein Barr, tales como el síndrome de Sjogren, tuberculosis osteoarticular, y enfermedades parasitarias tales como la leishmaniasis.

5

El término "enfermedad autoinmune" tal como se utiliza aquí se refiere a una enfermedad no maligna o trastorno que surge de y dirigido contra los propios tejidos de un individuo. Las enfermedades autoinmunes en este documento excluyen específicamente las enfermedades o condiciones malignas o cancerosas, especialmente con exclusión de linfoma de células B, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia de células pilosas y leucemia mieloblástica crónica. Ejemplos de enfermedades autoinmunes o trastornos incluyen, pero no se limitan a, las respuestas inflamatorias como las enfermedades inflamatorias de la piel incluyendo psoriasis y dermatitis (por ejemplo, dermatitis atópica); esclerodermia y esclerosis sistémica; respuestas asociadas con enfermedad inflamatoria del intestino (tales como la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); síndrome de dificultad respiratoria (incluyendo síndrome de dificultad respiratoria del adulto; SDRA); dermatitis; meningitis; encefalitis; uveítis; colitis; glomerulonefritis; condiciones alérgicas como eczema y asma y otras condiciones que implican la infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas; aterosclerosis; deficiencia de adhesión de leucocitos; artritis reumatoide; lupus eritematoso sistémico (SLE); diabetes mellitus (por ejemplo, diabetes mellitus Tipo I o diabetes mellitus insulina mellitus dependiente); esclerosis múltiple; Síndrome de Reynaud; tiroiditis autoinmune; encefalomiелitis alérgica; síndrome de Sjorgen; diabetes de inicio juvenil; y las respuestas inmunes asociadas con la hipersensibilidad retardada aguda mediada por citoquinas y linfocitos T, típicamente se encuentran en tuberculosis, sarcoidosis, polimiositis, granulomatosis y vasculitis; anemia perniciosa (enfermedad de Addison); enfermedades que implican diapedesis de leucocitos; trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC) ; síndrome de lesión múltiple de órganos; anemia hemolítica (incluyendo, pero no limitado a crioglobulinemia o anemia positiva Coombs); miastenia gravis; enfermedades mediadas por complejos antígeno-anticuerpo; enfermedad anti-glomerular de la membrana basal; síndrome antifosfolípido; neuritis alérgica; la enfermedad de Graves; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; penfigoide ampollar; pénfigo; poliendocrinopatías autoinmunes; enfermedad de Reiter; síndrome del hombre rígido; enfermedad de Behcet; arteritis de células gigantes; nefritis de complejo inmune; nefropatía IgA; polineuropatías IgM; púrpura trombocitopénica inmune (ITP) o trombocitopenia autoinmune, etc.

35

En una realización particular, dicha enfermedad autoinmune y/o inflamatoria es una enfermedad reumática inflamatoria. Preferiblemente, dicha enfermedad reumática inflamatoria

se selecciona de entre el grupo que consiste en artritis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide juvenil, artritis psoriásica y la espondiloartropatía.

- 5 Los niveles elevados de TNF se encuentran en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, artritis psoriásica y espondilitis anquilosante y juegan un papel importante tanto en la inflamación patológica y la destrucción de las articulaciones que son características de estas enfermedades. En consecuencia, en una realización preferida, dicha enfermedad reumática inflamatoria se selecciona de artritis reumatoide, artritis
10 reumatoide juvenil, artritis psoriásica y espondilitis anquilosante.

En otra realización, dicha enfermedad autoinmune y/o inflamatoria se selecciona de artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y síndrome de Sjögren. En una realización preferida, dicha enfermedad autoinmune y/o inflamatoria es artritis reumatoide.

- 15 Las correlaciones de los niveles de anti-CD26 con parámetros de actividad de la enfermedad, en particular con la sensibilidad de las articulaciones, han sido observadas por los inventores (**Ejemplo 6**). Cabe destacar que, de acuerdo con el Ejemplo 6.1 los niveles de anti-CD26 de los tres isotipos parecen correlacionarse negativamente con el recuento de articulaciones dolorosas (TJC) cuando se considera toda la cohorte. Además, el antígeno CD26 usado en el
20 ELISA es no citrulinado lo que sugiere que los autoanticuerpos detectados reconocerían una forma sCD26 no citrulinada. Tomados en conjunto estos datos pueden sugerir que los anticuerpos anti-CD26 aparecen en una etapa temprana de la patogénesis de la AR. De acuerdo con ello, en una realización preferida, dicha enfermedad autoinmune y/o inflamatoria
25 está en un estado de progresión temprano, preferiblemente muy temprano.

La etapa (a) del método de acuerdo con el primer aspecto de la invención requiere la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 en una muestra, aislada de un sujeto, que contiene anticuerpo.

- 30 El término CD26 tal como se utiliza aquí se refiere a CD26 humano (UniProtKB - P27487), también conocida como dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV). Su actividad enzimática se caracteriza por la liberación de un dipéptido N-terminal, Xaa-Yaa-|-Zaa-, de un polipéptido, preferentemente cuando Yaa es Pro, siempre que Zaa no sea ni Pro ni hidroxiprolina.

- 35 El término "CD26" abarca, 240 kDa de la glicoproteína de membrana homodimérica tipo II compuesta de dos subunidades de 120 kDa. (Mentlein R, Int Cytology Journal, 2004, 235:

165-213). Cada uno de los homodímeros de la forma unida a la membrana se caracterizan por una secuencia que consiste en las posiciones 1 a 766 de SEQ ID NO: 1 y la forma soluble o "sCD26" se caracteriza por una secuencia que consiste en las posiciones 39 a 766 de SEQ ID NO: 1, como se muestra a continuación en la Tabla 1 a continuación.

5

Posiciones de SEQ ID NO:1	Longitud	Descripción	UNIPROT identificador	SEQ ID NO
1 – 766	766	Dipeptidyl peptidase 4 membrane form	PRO_0000027213	SEQ ID NO:1
39 – 766	728	Dipeptidyl peptidase 4 soluble form	PRO_0000027214	SEQ ID NO:2

SEQ ID NO: 1 (PRO_0000027213) tiene la siguiente secuencia:

10 MKTPWKVLLG LLGAAALVTI ITVPVLLNK GTDDATDSR KTYTLTDYLK NTYRLKLYSL 60
 RWISDHEYLY KQENNILVFN AEYGNSSVFL ENSTFDEFGH SINDYSISPD GQFILLEYN 120
 VKQWRHSYTA SYDIYDLNKR QLITEERIPN NTQVWTWSPV GHKLAYVWNN DIYVKIEPNL 180
 PSYRITWTGK EDIYNGITD WVEEEVFSA YSALWWS PNG TFLAYA QFND TEVPLIEYSF 240
 YSDESLQYPK TVRVPYPKAG AVNPTVKFFV VNTDSLSSVT NATSIQITAP ASMLIGDHYL 300
 CDVTWATQER ISLQWLRIQ NYSVMDICDY DESSGRWNCL VARQHIEMST TGWVGRFRPS 360
 15 EPHFTLDGNS FYKIISNEEG YRHICYFQID KKDCTFITKG TWEVIGIEAL TSDYLYYISN 420
 EYKGMPPGGRN LYKIQLSDYT KVTCLSCENL PERCQYYSVS FSKEAKYYQL RCGPGLPLY 480
 TLHSSVNDKG LRVLEDNSAL DKMLQNVQMP SKKLDIFIILN ETKFWYQMIL PPHFDSKKY 540
 PLLLDVYAGP CSQKADTVFR LNWATYLAST ENIIVASFDG RSGYQGDKI MHAINRRLGT 600
 FEVEDQIEAA RQFSKMGFVD NKRIAIWGS YGGYVTSMVL GSGSGVFKCG IAVAPVSRWE 660
 20 YYDSVYTERY MGLPTPEDNL DHYRNSTVMS RAENFKQVEY LLIHGTADDN VHFQQAQIS 720
 KALVDVGVD F QAMWYTD EDH GIASSTA HQH IYTHMSHF I K QCFSLP 766

El término "CD26" también puede abarcar secuencias parcialmente idénticas, preferiblemente sustancialmente idénticas a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. Estos se conocen colectivamente como "variantes de CD26" y pueden obtenerse mediante la modificación de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 mediante sustitución, supresión y/o adición.

Variantes de supresión de CD26 y fragmentos antigénicos de CD26 se caracterizan por contener al menos una región antigénica o epítipo. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de epítopos CD26 son los definidos por la unión de anti-CD26 mAb conocidos ya que se han descrito anteriormente, tales como 4G8, 11H9, 1F7, 10F8A, 12E3B, 14D10, Tal, 5F8, 2F9, TA5.9, 18H3A, 16D4B, 9C11 (ver anti-CD26 mAb y su respectiva unión a CD26 en la Figura 1 de Dong RP, et al, Mol Immunol 1998, 35: 13-21) y anti-FLAG, 22C3, DS2-7, TA5.9, 1F7, 202-36, L272, Ta.1, BA5, CB.1, A3, A10, B10, F11 y C3 (ver anti-CD26 mAb y su respectiva

unión a variantes de CD26 en la Tabla 1 de Hühn J et al, Cell Immunol 1999; 192: 33-40, o Torimoto Y et al, Mol Immunol 1992; 29: 183-92, o Granados et al, Nat Commun 2014; 5: 3600) han descrito recientemente posiciones de aminoácidos 145-154 de CD26 humano como un péptido de MHC-I asociado (MIP) reconocido por las células T CD8.

5

En una realización, una variante de CD26 puede tener uno o más residuos de aminoácidos. Dicho residuo(s) aminoácido(s) adicional puede ser cualquier aminoácido, que puede ser o bien un L- y/o D-aminoácido, de origen natural y de otro modo. Preferiblemente, el aminoácido es cualquier aminoácido de origen natural tales como alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptófano o tirosina.

10

Sin embargo, el/los residuo(s) aminoácido también puede(n) ser (un) aminoácido(s) modificado(s) o inusual(es). Ejemplos de ellos son 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, 2- ácido aminopimélico, ácido 2,4-diaminobutírico, desmosina, 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, N-etilglicina, N-etilasparagina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 3-hydroxyproloine, 4-hydroxyproloine, isodesmosina , alo-isoleucina, N-metilglicina, N-metilisoleucina, 6-N-metilisina, N-metilvalina, norvalina, norleucina u ornitina.

20

Además, el/los aminoácidos(s) puede(n) estar sujeto(s) a modificaciones tales como modificaciones postraduccionales. Ejemplos de modificaciones incluyen la acetilación, amidación, el bloqueo, la formilación, la hidroxilación de ácido γ -carboxiglutámico, glicosilación, metilación, fosforilación, sulfatación y citrulinación. Preferiblemente, CD26 es no citrulinado.

25

Si más de un residuo de aminoácido adicional está presente en el polipéptido, los residuos de aminoácidos pueden ser iguales o diferentes uno del otro. El polipéptido CD26 puede ser flanqueado por el/los resto(s) de aminoácido(s) C-terminal, N-terminal, o C- y N-terminal.

30

En una realización particular de la invención, dicha variante de CD26 es una variante que tiene al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 99% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO : 2 que se deriva por sustituciones conservadoras. Las sustituciones conservadoras son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales y propiedades químicas y son bien conocidos para una persona experta en la técnica. Ejemplos de tales familias son

35

aminoácidos con cadenas laterales básicas, con cadenas laterales ácidas, con cadenas laterales alifáticas no polares, con cadenas laterales aromáticas no polares, con cadenas laterales polares sin carga, con cadenas laterales pequeñas, con cadenas laterales grandes etc. en una realización, una sustitución conservadora se incluye en el polipéptido. En otra
 5 realización, dos sustituciones conservadoras o menos se incluyen en el polipéptido. En una realización adicional, tres sustituciones conservadoras o menos se incluyen en el polipéptido.

CD26 se puede obtener por técnicas de producción de proteínas recombinantes o mediante purificación a partir de suero humano. Las técnicas de producción de proteínas
 10 recombinantes estándar usan células huésped procariotas o eucariotas para producir CD26. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias (por ejemplo *E. coli*), levaduras, insectos, o células de mamífero. Un número de sistemas de expresión eucariotas están disponibles para la expresión de proteínas secretadas y proteínas unidas a la membrana, incluyendo los que contienen modificaciones post-traduccionales únicas. Las plataformas de expresión
 15 eucariotas más comunes en la actualidad incluyen levaduras (por ejemplo, *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*), células de insecto (*Spodoptera frugiperda* o *Trichoplusia ni*), y sistemas de células de mamíferos (incluyendo una variedad de líneas celulares transformadas y/o genéticamente modificados). Sistemas de células de mamíferos incluyen, pero no se limitan a simio, humano, perro y células de roedores. Los ejemplos de células
 20 humanas son células (WO01/38362), MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38, células HEK-293 (ATCC CRL-1573), células HeLa (ATCC CCL-75) (ATCC PER.C6 CCL2), y células pulmonares fetales rhesus (ATCC CI- 160). Ejemplos de células de primates no humanos son células Vero (ATCC CCL81), células COS-1 (ATCC CRL-1650) o células COS-7 (ATCC CRL-1651). Los ejemplos de células de perros son células MDCK (ATCC CCL-34). Ejemplos de
 25 células de roedor son células de hámster, como BHK21-F, las células HKCC, o células CHO. Cualquier sistema de expresión compatible de proteínas puede ser utilizado para producir CD26. Los sistemas de expresión adecuados incluyen animales transgénicos descritos en Gene Expression Systems, Academic Press, eds. por Fernández et al., 1999. Además, cualquier vector de expresión conocido en la técnica se puede utilizar. Se pueden utilizar
 30 enzimas para generar proteínas de longitud menor a la completa, mediante proteólisis enzimática desde la proteína de longitud completa o de proteínas de longitud parcial.

Los métodos de síntesis química, tales como la síntesis de péptidos en fase sólida, también se pueden utilizar para sintetizar CD26. En otra realización particular, CD26 ha sido
 35 sintetizado por medio de cualquier técnica conocida en la técnica de la síntesis de péptidos.

CD26 se puede purificar por medio de cualquier técnica conocida en la técnica de purificación de proteínas. Ejemplos de estas técnicas incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y los métodos de inmunoadinidad.

- 5 En una realización particular, CD26 es la forma soluble de CD26 (sCD26), incluyendo variantes de la misma. En una realización preferida, sCD26 se ha obtenido por medios recombinantes y purificado a partir de una célula huésped adecuada como se describe anteriormente. En una realización más preferida, dicho sCD26 recombinante se ha purificado a partir de la línea celular de mieloma de ratón NS0, como el sCD26 disponible
10 comercialmente de Sistemas RnD, EE.UU. (1180-SE-010). En otra forma de realización más preferida, dicho sCD26 recombinante se ha purificado a partir de células Sf9 infectadas con baculovirus, tales como el sCD26 disponible comercialmente de Sigma-Aldrich, EE.UU. (D4943).
- 15 Los métodos de la presente invención pueden aplicarse a muestras de individuos de ambos sexos, es decir, hombres o mujeres, y a cualquier edad.

En algunas realizaciones, dicho sujeto no ha recibido previamente o no está sometido a ningún tratamiento biológico contra dicha enfermedad autoinmune y/o inflamatoria,
20 preferiblemente no ha recibido previamente o no está sometido a ningún tratamiento contra dicha enfermedad autoinmune y/o inflamatoria.

En otras realizaciones, dicho sujeto ha recibido previamente o está sometido a un tratamiento contra dicha enfermedad autoinmune y/o inflamatoria, preferiblemente, en el que dicho
25 tratamiento se selecciona del grupo que consiste en:

- i. FAME;
- ii. agentes anti-TNF alfa;
- iii. agentes anti-CD20; y
30 iv. agentes anti-IL6R y / o proteínas de fusión CTLA4-Fc.

El término "muestra que contiene anticuerpo" se ha definido anteriormente. Estos tipos de muestras se utilizan habitualmente en la práctica clínica y una persona experta en la técnica sabrá cómo identificar los medios más apropiados para su obtención y preservación. Una vez
35 que una muestra ha sido obtenida, se puede utilizar fresca, o se puede congelar o conservarla utilizando los medios apropiados (por ejemplo, como una muestra de tejido incluido en parafina fijado con formalina). Cuando la cuantificación se lleva a cabo por análisis

de inmunohistoquímica (IHC), se utilizan típicamente secciones delgadas de la muestra biológica inmovilizadas sobre portaobjetos recubiertos. Estas secciones, cuando derivan de una muestra de tejido incluidas en parafina, se desparafinan y se tratan preferiblemente de modo adecuado para recuperar la proteína a detectar. La detección puede llevarse a cabo en muestras individuales o en microarrays de tejidos.

Preferiblemente, esta muestra que contiene anticuerpo es sangre entera, suero o plasma, más preferiblemente es suero.

La cuantificación de los niveles de anticuerpo en la etapa a) del primer aspecto de la invención puede ser expresada en términos de "concentración de anticuerpo" y/o "niveles de anticuerpo". El término "niveles de anticuerpo" y "concentración de anticuerpo" se puede usar en el presente documento de manera intercambiable.

El término "concentración de anticuerpo" tal como se utiliza aquí se refiere a la cantidad total de anticuerpo (proteína) en solución sin considerar la función. La concentración de anticuerpo se puede estimar utilizando un ensayo de proteína en general o un método de inmunoglobulina específica.

El término "nivel de anticuerpo" tal como se utiliza aquí se refiere a la dilución funcional (o concentración de trabajo) de una muestra de anticuerpo que es necesario para alcanzar un nivel mínimo de detección específica en un método de ensayo dado. El valor mínimo aceptable exacto se establece por el investigador, pero por lo general se define por referencia a una relación estadísticamente significativa de un valor por encima del ruido de fondo (o blanco, o background). Los niveles de anticuerpos generalmente se consideran una medida específica para cada ensayo.

Preferiblemente, la determinación de los niveles de anticuerpo en la etapa a) del primer aspecto de la invención se lleva a cabo por un método de inmunoglobulina específica. Varios tipos de inmunoensayos son conocidos por un experto en la técnica para la cuantificación de proteínas de interés. Estos métodos se basan en el uso de reactivos de afinidad, que puede ser cualquier anticuerpo o ligando que se une específicamente a la proteína diana, y que está marcado, preferiblemente, para su detección.

Por ejemplo, técnicas de transferencia o inmunotransferencia permiten la comparación de la abundancia relativa de las proteínas separadas por un gel electroforético (por ejemplo, proteínas nativas por la estructura 3-D o proteínas desnaturalizadas por la longitud del

polipéptido). Técnicas de inmunotransferencia utilizan anticuerpos (u otros ligandos específicos en las técnicas relacionadas) para identificar proteínas diana entre un número de especies de proteínas no relacionadas. Implican la identificación de la proteína diana a través de reacciones específicas antígeno-anticuerpo (o proteína-ligando). Las proteínas típicamente se separan por electroforesis y se transfieren a una lámina de material polimérico (generalmente de nitrocelulosa, nylon, o difluoruro de polivinilideno). Los ensayos “dot and slot blot” son procedimientos simplificados en los que las muestras de proteínas no están separados por electroforesis pero inmovilizadas directamente sobre una membrana.

En algunas realizaciones de la invención, la cuantificación de inmunoglobulina puede ser realizada mediante la cuantificación de las células que expresan inmunoglobulinas (por ejemplo células B que producen anticuerpos anti-CD26 de un isotipo dado). Esto puede ser posible, por ejemplo, mediante ensayos de inmunohistoquímica, donde las proteínas se detectan directamente en células de un tejido. Se está destacando el papel de las células B y autoanticuerpos en los eventos destructivos tejido en enfermedades autoinmunes, y aumentando así el interés por identificar la presencia y localización de las células B autorreactivas y células plasmáticas secretoras de autoanticuerpos. Para la visualización y el análisis de las células B autorreactivas, el antígeno de interés es seleccionado, producido y purificado a partir de fuentes nativas o recombinantes. El etiquetado apropiado (por ejemplo biotinilación) del antígeno purificado y su posterior uso en inmunohistoquímica en secciones del tejido bajo análisis permiten la detección de las células B autorreactivas y células plasmáticas. La doble tinción con marcadores específicos de células o por presencia de Ig intracelular permite la caracterización de la célula o la determinación del isotipo Ig del autoanticuerpo producido por las células B autorreactivas individuales. Con esta técnica, la identificación, así como la cuantificación de células autorreactivas dentro de los tejidos se pueden realizar; también es posible analizar la relación espacial respecto de las células residuales u otras células infiltrantes del órgano diana. Para fines ilustrativos, un ejemplo no limitativo de cómo esto puede llevarse a cabo se describe en Wharen-Herlenius y Salomonsson (Methods Mol Med 2001, 36: 19-24).

La cuantificación de las células que expresan inmunoglobulina también puede ser posible en cualquier tipo de fluidos biológicos que contienen anticuerpos utilizando técnicas bien conocidas en la materia tales como la citometría de flujo o el clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS). Una selección y cuantificación de células que secretan anticuerpo específico se pueden realizar utilizando uno de los muchos métodos descritos en la literatura, por lo general sobre la base de la expresión de isotipos de anticuerpos específicos y/o marcadores de superficie celular en su superficie. En particular, varias tecnologías para la

purificación de las células secretoras de anticuerpos a partir de muestras humanas hacen uso de diferentes medios y condiciones para la selección positiva o negativa de las mismas. Estas células son más fácil y eficientemente seleccionadas por la separación física de aquellas que expresan marcadores de superficie celular específica para células que expresan y secretan anticuerpos (por ejemplo, células B). Los protocolos específicos se pueden encontrar en la literatura (ver Callard R and Kotowicz K "Human B-cell responses to cytokines" in Cytokine Cell Biology: A practical Approach. Balkwill F. (ed.) Oxford University Press, 2000, pg.17-31).

Tradicionalmente, la cuantificación de proteínas en solución se ha llevado a cabo por inmunoensayos en un soporte sólido. Dicho inmunoensayo puede ser, por ejemplo un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), un ensayo de inmunoabsorción ligado a fluorescencia (FLISA), inmunoensayo de quimioluminiscencia (CIA), o radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo enzimático multiplicado, radioinmunoensayo en fase sólida (SPROA), ensayo de polarización de fluorescencia (FP), ensayo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), ensayo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo (TR-FRET), ensayo de resonancia de plasmón superficial (SPR) También abarcan específicamente Multiplex y cualquier versión de próxima generación de cualquiera de los anteriores, tales como inmunoensayos de citometría de flujo basados en esferas (por ejemplo, basados en la tecnología Luminex xMAP).

En una realización particular, dicho inmunoensayo es un ensayo ELISA, una célula-ELISA o cualquier versión multiplex de los mismos.

Otros métodos que se pueden utilizar para la cuantificación de proteínas son las técnicas basadas en la espectrometría de masas (MS) como la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC / MS), que se describe por ejemplo en US2010 / 0173786, o en tándem LC-MS / MS (WO2012 / 155019, US2011 / 0039287, Rauh M, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2012; 59-67) y el uso de matrices de péptidos, proteínas o anticuerpos y versiones multiplex de las técnicas anteriores, así como la siguiente generación de tales técnicas y combinaciones de los mismos.

En una realización particular, los niveles de anticuerpos anti-sCD26 presentes en una muestra de suspensión que contiene anticuerpos se determinan mediante un inmunoensayo en el que sCD26 se ha revestido sobre un soporte de fase sólida. En otra realización, los niveles de anticuerpos anti-CD26 presentes en una muestra de suspensión que contiene anticuerpos se determinan mediante un inmunoensayo en el que una célula que expresa CD26 se encuentra en un soporte de fase sólida (por ejemplo célula-ELISA).

A continuación se describe un método general para la determinación de anticuerpos anti-sCD26 de un isotipo seleccionado.

5 sCD26, o cualquier fragmento antigénico de la misma, se encuentra unido al soporte sólido. Puede ser adsorbido o acoplado químicamente a un soporte de fase sólida. Cualquier medio conocido en la técnica para la inmovilización de una proteína o péptido a un soporte sólido se puede utilizar. sCD26 puede ser o bien covalentemente o unido al soporte en fase sólida mediante técnicas tales como unión covalente a través de un enlace amida o éster, o
10 mediante adsorción no covalente. También se puede unir mediante pares de unión tales como biotina y avidina o anticuerpo y antígeno. Después de que sCD26 se fije a la fase sólida, el soporte de fase sólida se puede incubar con una solución de bloqueo (que contiene una proteína de bloqueo tal como albúmina de suero bovino) para reducir la adsorción no específica de anticuerpos en una muestra de ensayo a la superficie de soporte.

15 Se pueden utilizar varios soportes en fase sólida, incluyendo, pero no limitado a, vidrio, poliestireno, polipropileno, nitrocelulosa, dextrano u otros materiales. Las formas adecuadas de los soportes en fase sólida incluyen perlas, micropartículas, tubos, tejidos o placas formadas a partir de, o recubiertos con estos materiales. En una reclamación preferida, el
20 soporte sólido comprende pocillos de microtitulación, tal como una placa de microtitulación de 96 pocillos.

Un anticuerpo de detección se usa para evaluar el anticuerpo anti-sCD26 unido al soporte en fase sólida. El anticuerpo de detección utilizado para este propósito puede ser específico de
25 isotipo, por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, o IgM. El anticuerpo de detección específico de isotipo se puede marcar y detectar. También se pueden determinar sub-isotipos del anticuerpo.

El anticuerpo de detección puede estar marcado. El marcador puede ser cualquier
30 composición detectable. Cualquier medio de análisis conocido en la técnica se puede usar para determinar o detectar el anticuerpo de detección. Estos medios incluyen el uso de la espectroscopia, química, fotoquímica, bioquímica, inmunoquímica, o la óptica. El marcador puede ser, por ejemplo, una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, y otros utiliza comúnmente en un ELISA), un radiomarcador (por
35 ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , o ^{32}P), un compuesto quimioluminiscente (por ejemplo, luciferina, y 2,3-dihidroftalazinedionas, luminol, etc.), un colorante fluorescente (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina, etc.), o cualquier otro colorante conocido en la técnica.

El marcador se puede acoplar directa o indirectamente (por ejemplo, a través de pares de unión tales como biotina y avidina) a la detección de anticuerpos de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Como se indicó anteriormente, se puede utilizar una amplia
 5 variedad de etiquetas. La elección del marcador puede depender de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con el compuesto, requisitos de estabilidad, la instrumentación disponible, o disposiciones de eliminación.

Los anticuerpos de detección pueden ser detectados o cuantificados por cualquier método
 10 adecuado conocido en la técnica. Un marcador en un anticuerpo se puede detectar mediante un contador gamma si la etiqueta es un emisor gamma radiactivo, o por un fluorímetro, si el marcador es un material fluorescente. En una reclamación preferida, el anticuerpo de detección es una inmunoglobulina específica de la especie conjugada con HRP. Cualquier sustrato conocido de HRP se puede utilizar. Los ejemplos no limitantes son ABTS (2,2'-
 15 azinobis [ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico] -diammonium sal), OPD (o-fenilendiamina diclorhidrato) y TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina). Con cada uno de estos sustratos se obtiene un producto de reacción que puede detectarse ópticamente con una absorbancia máxima a 410 nm, 650 nm, 492 nm o 450 nm de longitud de onda, para los casos comentados.

Los resultados del ensayo pueden ser cualitativos o cuantitativos. La cantidad de marcador asociado con el soporte puede ser comparado con los controles positivos y negativos con el fin de determinar la presencia de anticuerpos anti-sCD26. Los controles se suelen ejecutar de forma concomitante con la muestra a ensayar. Un control positivo puede ser un suero que
 25 contiene anticuerpos que son inmunorreactivos con sCD26. Un control negativo puede ser un suero que no contiene anticuerpos que son inmunorreactivos con el sCD26. Para la cuantificación, se usa una curva estándar utilizando cantidades conocidas de anticuerpo del mismo isotipo, que puede, pero no tiene que ser, anti-sCD26.

Los anticuerpos para uso como controles positivos se pueden producir utilizando fragmentos de, o la secuencia completa, de aminoácidos de sCD26. "Anticuerpo" como se usa en este documento incluye moléculas intactas de inmunoglobulina, así como fragmentos de las mismas, tales como Fab, F (ab ') 2, y Fv, que son capaces de unirse a un epítipo de la proteína diana (por ejemplo, sCD26). Cualquier tipo de anticuerpo conocido en la técnica se
 35 puede generar para unirse específicamente a un epítipo de sCD26. Los anticuerpos monoclonales o policlonales se pueden hacer como es bien conocido en la técnica.

Se puede utilizar cualquier técnica disponible para la purificación de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden purificar por métodos conocidos, tales como la separación de afinidad utilizando proteína A, cromatografía líquida de alta presión sobre gel de sílice alquilado en fase inversa, o filtración en gel. Los anticuerpos también se pueden

5 pasar a través de una fase sólida a la que se une sCD26. Los anticuerpos anti-sCD26 se unirán al sCD26 unido al soporte sólido y los contaminantes pueden ser lavados. Los anticuerpos unidos se pueden eluir, por ejemplo, con un tampón que tiene una alta concentración de sal, o bajo pH.

10 Los parámetros particulares empleados en el ensayo para la determinación de los niveles de anticuerpos anti CD26 pueden variar ampliamente dependiendo de diversos factores tales como la concentración de anticuerpo en la muestra, la naturaleza de la muestra, el tipo de inmunoensayo empleado y similares. Las condiciones óptimas se pueden establecer fácilmente por los expertos en la técnica. Condiciones de ensayo típicas incluyen un rango de

15 temperatura de aproximadamente 4 ° C a aproximadamente 45 ° C y un intervalo de valores de pH de aproximadamente 5 a 9. Los tiempos de incubación pueden variar también ampliamente dependiendo de la naturaleza del ensayo, y generalmente varían de aproximadamente 0,1 minutos a aproximadamente 24 horas. Una amplia variedad de tampones, por solución salina tamponada con TRIS ejemplo, o con fosfatos, se puede

20 emplear, y otros reactivos tales como sal para mejorar la fuerza iónica, proteínas tales como albúmina de suero, estabilizantes y detergentes no iónicos también pueden ser incluidos. Las condiciones ejemplares para las inmunoglobulinas totales y autoanticuerpos anti-CD26 de los isotipos IgG, IgM e IgA se dan en el Ejemplo 1.

25 La relación entre los niveles de anticuerpos anti-CD26 de IgG y los niveles totales de anticuerpos IgG

Como alternativa, o además de determinar los niveles de anticuerpos IgG anti-CD26, los métodos de la invención pueden incluir la determinación de la relación entre los niveles de

30 anti-CD26 de IgG de anticuerpos y los niveles totales de anticuerpos IgG (en adelante denominado como "cociente anti-CD26 IgG / total IgG ").

Los niveles de anticuerpos totales de un isotipo particular pueden ser determinados por un inmunoensayo en un soporte sólido en el que, en lugar de sCD26 como se describió

35 anteriormente, un anticuerpo anti-humano del isotipo correspondiente (por ejemplo, IgM, IgG o IgA) en general de otra especie animal es unido al soporte sólido, por ejemplo, un conejo policlonal anti-IgM humana, anti-IgG o anti-IgA.

En consecuencia, la relación entre los niveles de anticuerpos anti-CD26 de IgG y los niveles de anticuerpos IgG total (es decir, la "relación de anti-CD26 IgG") se obtiene en el presente documento dividiendo los niveles de anti-CD26 de anticuerpos IgG por los niveles totales de anticuerpos IgG.

Por consiguiente, en otra realización particular, los métodos de la invención comprenden los siguientes pasos:

- a) determinar los niveles de anticuerpos IgG anti-CD26 y / o la relación de anti-CD26 IgG en una muestra aislada de dicho sujeto que contiene anticuerpo;
- b) comparar el nivel y / o la relación en dicha muestra que contiene anticuerpo con un valor de referencia.

En una realización particular adicional, los métodos de la invención comprenden los siguientes pasos:

- a) determinar los niveles de anticuerpos IgM anti-CD26 y / o la relación de anti-CD26 IgG en una muestra que contiene anticuerpo aislado de dicho sujeto;
- b) comparar el nivel y / o la relación en dicha muestra que contiene anticuerpo con un valor de referencia.

En una realización preferida, el método de acuerdo con el primer aspecto de la invención, y cualquier aspecto relacionado como se describe anteriormente, comprende las siguientes etapas:

- a) la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 de IgG en una muestra que contiene anticuerpo aislado de dicho sujeto;
- b) comparar los niveles en dicha muestra que contiene anticuerpo con un valor de referencia.

En la etapa b), los niveles y / o relación determinada en dicha muestra biológica se comparan con valores de referencia.

Un valor de referencia representa un valor de umbral del biomarcador relevante (por ejemplo, los niveles de anticuerpos anti-CD26 de IgG) a la que se pueden comparar los niveles medidos de un sujeto. El nivel de referencia puede seleccionarse en base a la finalidad prevista de la prueba o ensayo que se va a realizar . Por ejemplo, un nivel de referencia puede determinarse para los propósitos de la identificación de sujetos afectados por una enfermedad autoinmune y / o inflamatoria, mientras que el mismo o diferente nivel de

referencia se puede utilizar para el seguimiento de la progresión o gravedad de la enfermedad en un sujeto o la capacidad de respuesta a un tratamiento.

La selección de un nivel de referencia adecuado para una prueba o ensayo dado está dentro
 5 del nivel de experiencia en la técnica. La elección del valor de referencia no es absoluta. Por
 ejemplo, un valor relativamente bajo se puede usar ventajosamente para reducir la incidencia
 de falsos negativos, pero también puede aumentar la probabilidad de falsos positivos. En
 consecuencia, como para la detección precoz, diagnóstico o técnicas de monitorización, el
 valor de referencia puede estar basado en una serie de factores, incluyendo pero no limitado
 10 a, los costos, el beneficio del diagnóstico precoz y el tratamiento, la invasividad de los
 métodos de diagnóstico y de seguimiento para las personas que tener resultados falsos
 positivos, la finalidad prevista del ensayo o prueba, los límites de detección precisa en el tipo
 de muestra particular, o la prevalencia y la media del biomarcador dado en la población
 relevante, el nivel deseado de significación estadística de los resultados, el nivel de
 15 cuantificación deseado en términos de riesgo de la enfermedad, la presencia, la progresión, o
 la gravedad, y otros factores que se consideran rutinariamente en el diseño de ensayos de
 selección.

Se pueden determinar el valor de umbral o nivel de corte mediante el uso en los métodos de
 20 la invención. El término "valor de referencia" como se utiliza aquí también abarca un umbral o
 punto de corte. Una variedad de métodos estadísticos y matemáticos para establecer el
 umbral o nivel de corte para un biomarcador particular, son conocidos en la técnica anterior y
 se puede seleccionar, por ejemplo, sobre la base de datos de las curvas ROC.

Un experto en la técnica apreciará que este umbral o punto de corte de los niveles de
 25 expresión se puede variar, por ejemplo, moviendo a lo largo del gráfico ROC para un
 biomarcador, o combinaciones particulares de los mismos, para obtener diferentes valores
 para la sensibilidad o especificidad sin que ello afecte al rendimiento global de ensayo. El
 mejor punto de corte se refiere al valor obtenido de la línea ROC para un biomarcador
 30 particular que produce la mejor sensibilidad y especificidad. Los valores de sensibilidad y
 especificidad se calculan sobre el rango de umbrales (cut-off). Así, los valores de corte de
 umbral o se pueden seleccionar de tal manera que la sensibilidad y / o especificidad son al
 menos aproximadamente 70%, y pueden ser, por ejemplo, al menos 75%, al menos 80%, al
 menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al
 35 menos 99% o al menos 100% en al menos 60% de la población de pacientes ensayados, o
 en al menos 65% , 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o, preferiblemente, 100% de la
 población ensayada.

En algunas realizaciones de los métodos en los aspectos primero y relacionados de la invención, dicho valor de referencia corresponde a los respectivos niveles de anticuerpos anti-CD26, o del valor del cociente mencionado, en sujetos sanos. El término "sujetos sanos" como se utiliza aquí se refiere a una población no afectada apropiada.

En otras realizaciones de los métodos en los aspectos primero y relacionados de la invención, dicha enfermedad es una enfermedad reumática inflamatoria y dicho valor de referencia corresponde al valor de los respectivos niveles de anticuerpos anti-CD26, o el cociente, de una enfermedad reumática que no es una enfermedad reumática inflamatoria, como la osteoartritis.

Al comparar los niveles del sujeto con dicho valor de referencia o de control (por ejemplo, la media o la mediana de los niveles o de un valor de corte), el grado de variación de los niveles en las muestras examinadas con respecto a un valor de referencia pueden ser, por ejemplo, por lo menos 5%, en al menos 10%, en al menos un 15%, en al menos un 20%, en al menos un 25%, en al menos un 30%, en al menos un 35%, en al menos un 40%, en al menos 45 %, en al menos un 50%, en al menos un 55%, en al menos un 60%, en al menos un 65%, en al menos un 70%, en al menos un 75%, en al menos un 80%, en al menos un 85%, en al menos 90%, en al menos un 95%, en al menos un 100%, en al menos 110%, en al menos 120%, en al menos 130%, en al menos 140%, en al menos 150%, o más.

Alternativamente, o además, los sujetos que tienen más de aproximadamente 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 2, 3, 4, 5, 8, 10 o 20 veces más alta concentración de biomarcador que el valor de referencia (por ejemplo, la media o la mediana de los niveles o un corte valor -off) para una población no afectada apropiada según lo medido en condiciones similares o idénticas puede ser identificado como tener, o que se sospecha que tiene, una enfermedad autoinmune y / o enfermedad inflamatoria.

Preferiblemente, esta variación es estadísticamente significativa. El término "significativo" o "estadísticamente significativa" cuando se refiere a las diferencias entre los valores de muestra de ensayo y el valor de control o de referencia, se refiere a la condición, cuando se utiliza el análisis estadístico apropiado, de la probabilidad de que la misma sea menor que 5%, p.ej $p < 0,05$. En otras palabras, la probabilidad de obtener los mismos resultados en base completamente al azar es de menos de 5 de cada 100 intentos. Un experto en la técnica sabrá cómo elegir el análisis estadístico apropiado. Por lo general, el análisis estadístico apropiado se determina en función de si la variable en estudio tiene una distribución normal,

por ejemplo mediante el uso de la prueba de Kolmogorov-Smirnov y de si existe homocedasticidad, que se determina, por ejemplo, con la prueba de Levene. Preferiblemente, en los casos en que hay una distribución normal y homocedasticidad, se utiliza un modelo paramétrico tal como t-test o la prueba ANOVA; y donde al menos uno de estos dos requisitos no se lleva a cabo a continuación un modelo no paramétrico como la prueba de Mann-Whitney o la prueba de Kruskal-Wallis se utiliza generalmente para comparar las variables continuas (no categorizados). Para las variables categorizadas normalmente se llevan a cabo la prueba de Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher.. Para comparaciones múltiples en una sola cohorte se utiliza normalmente la prueba t de Dunnett.

En realizaciones preferidas de los métodos de la invención, un aumento de los niveles de anticuerpos pertinentes anti-CD26 como se definió anteriormente (niveles por ejemplo, de anticuerpo anti-CD26 de IgG y / o el cociente de anti-CD26 IgG /total IgG y / o niveles de anticuerpos anti-CD26 IgM, y similar cociente) en la muestra sujeto, en relación con el valor de referencia, es indicativo de enfermedad. Preferiblemente, en el que dicho valor de referencia corresponde al valor de referencia respectivo en sujetos sanos.

Los métodos bajo el primer aspecto y los aspectos relacionados tal como se define anteriormente puede comprender además la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 del isotipo IgA en dicha muestra que contiene anticuerpo.

Por consiguiente, los niveles de anticuerpos anti-CD26, en algunas formas de realización de la invención se seleccionan del grupo que consiste en:

- i. los niveles de anticuerpos anti-CD26 de IgG y / o el cociente anti-CD26 /total IgG;
- ii. los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgM;
- iii. los niveles de IgG y / o el cociente citados en i) y los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgM;
- iv. los niveles de IgG y / o el cociente citados en i) y los niveles de anticuerpos anti-CD26 de IgA; y
- v. los niveles de IgG y / o el cociente citados en i) y el anti-CD26 IgM, y los niveles de anticuerpos anti-CD26 de IgA.

en el que, para cada uno de los grupos definidos, un aumento de cualquiera y preferiblemente de todos los niveles de anticuerpos o el cociente en la muestra del sujeto, con respecto a dicho valor de referencia, es indicativo de enfermedad y en el que dicho valor de referencia corresponde al valor de referencia respectivo en sujetos sanos.

En una realización preferida, dicho método comprende:

a) la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 isotipo IgG en una muestra del que contenga el anticuerpo;

- 5 b) la comparación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 isotipo IgG en una muestra conteniendo el anticuerpo con un valor de referencia; y

comprende además:

- 10 c) la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 isotipos IgM y / o IgA en una muestra conteniendo estos anticuerpos;

d) comparación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 isotipos IgM y / o IgA en una muestra conteniendo estos anticuerpos con un valor de referencia;

- 15 en donde un aumento del valor de los niveles de anticuerpos anti-CD26 isotipo IgG y/o IgM y / o los niveles de anticuerpos anti-CD26 isotipo IgA en una muestra del sujeto en relación con el valor de referencia es indicativo de la enfermedad, y en el que dicho valor de referencia corresponde al valor de referencia correspondiente (por ejemplo, los niveles medios) en sujetos sanos.

- 20 En una realización preferida de cualquiera de los anteriores, el aumento de los niveles de dicho anticuerpo anti-CD26 con respecto a dicho valor de referencia es de al menos 1,2x, preferiblemente de al menos 1,3x, más preferiblemente de al menos 1,4x, incluso más preferiblemente de al menos 1,5x, y lo más preferiblemente de al menos 2x. En una
25 realización más preferida, el aumento de IgG es de al menos 1,3x, el aumento de IgM es de al menos 1,4x, y el aumento de IgA es de al menos 1,3x.

- El método de acuerdo con el primer aspecto y aspectos relacionados puede comprender además la determinación de los niveles de anticuerpos IgA totales, que han demostrado un
30 alto valor de discriminación entre donantes sanos y toda la cohorte (véase la figura 15, AUC: 0,979) y entre donantes sanos y pacientes sometidos FARMes pero no terapia biológica (Figura 16, AUC: 0,947).

- El método de acuerdo con el primer aspecto y aspectos relacionados puede comprender
35 además la determinación de otros biomarcadores asociados a dichas enfermedades autoinmunes y / o inflamatorias, preferiblemente, dichos biomarcadores son seleccionados

del grupo consistente en anticuerpos anti-proteína citrulinada (ACPA), anticuerpos del factor reumatoide, anticuerpos anti-lectina de unión a manosa (MBL), velocidad de sedimentación globular (VSG), proteína C-reactiva (CRP), recuento de plaquetas, los niveles de hemoglobina y el hematocrito.

5

En una realización particular, éstos se seleccionan de una lista que comprende ESR, los niveles de concentración de PCR, anticuerpos anti-proteína citrulinada (ACPA), anticuerpos del factor reumatoide y anticuerpos anti-lectina de unión a manosa (MBL) que han sido previamente usado como marcadores de diagnóstico. Se proporcionan más detalles en Gupta B et al, J Autoimmun 2006; 27: 125-133, Afzal N et al, Clin Lab 2011, 57: 895-899, Takizawa Y et al, Ann Rheum Dis 2006; 65: 1013-1020, Vossenaar ER et al, Arthritis Res Ther 2004; 6: R142-R150 y EP0175270 que se incorporan en este documento como referencia.

10

15

En una realización particular, los anticuerpos anti-proteína citrulinada (ACPA) son determinados siendo el sujeto negativo para estos auto-anticuerpos anti-proteína citrulinada (ACPA).

20

25

En otra realización particular, opcionalmente en combinación con cualquiera de los anteriores, los métodos bajo el primer aspecto y aspectos relacionados pueden comprender además la determinación de parámetros clínicos. Los signos y / o síntomas cuya presencia/ausencia pueden ser determinados son: rigidez matutina, la artritis de tres o más articulaciones, afectación de la articulación de la mano, la artritis simétrica, nódulos reumatoides, y los cambios radiográficos (véase la Tabla 1 de Rindfleisch y Muller (American Family Physician 2005, 72(6), 1037-1047) y los criterios de clasificación ACR / EULAR (Ann Rheum Dis 2010; 69: 1580-1588).

30

35

Un "diagnóstico confirmado de la artritis reumatoide" o "artritis reumatoide definitiva" puede basarse en la presencia confirmada de sinovitis en al menos una articulación, la ausencia de un diagnóstico alternativo que explique mejor la sinovitis, y la obtención de una puntuación total de 6 o mayor (de un máximo posible de 10) a partir de las puntuaciones individuales en cuatro dominios: número y emplazamiento de articulaciones afectadas (rango 0-5), alteraciones serológicas (rango 0-3), respuesta de fase aguda elevada (rango 0-1) y duración de los síntomas (dos niveles, rango 0-1). El significado de estos parámetros están definidos en los criterios de clasificación ACR / EULAR (Ann Rheum Dis 2010; 69: 1580-1588).

El término "afectación de la articulación", tal y como se usa en el presente documento se refiere a cualquier articulación inflamada o sensible en el examen, con sinovitis confirmada

mediante imagen, Las articulaciones interfalángicas distales, las primeras articulaciones carpometacarpianas y las primeras articulaciones metatarsofalángicas son típicamente excluidas de la evaluación. Las categorías de distribución de las articulaciones son clasificadas generalmente de acuerdo con la ubicación y el número de articulaciones
5 afectadas, con la colocación en la categoría más alta posible, basándose en el patrón de afectación articular. El término "grandes articulaciones" como se usa en el presente documento, se refiere a hombros, codos, caderas, rodillas y tobillos. El término "pequeñas articulaciones" como se usa en el presente documento, se refiere a las articulaciones metacarpofalángicas, articulaciones interfalángicas proximales, articulaciones
10 metatarsofalángicas segunda a quinta articulaciones metatarsofalángicas, articulaciones interfalángicas del pulgar y de las muñecas.

Preferiblemente, el método de la invención comprende además el almacenamiento de los resultados del método en un soporte de datos. Los resultados del método de la invención
15 incluyen los valores UNR de expresión génica, la clasificación de un buen o mal pronóstico del sujeto, la clasificación del sujeto a la hora de tener resultados a corto o largo plazo después de la cirugía, y cualquier otra determinación de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención, así como cualquier tratamiento matemático o estadístico de los mismos. Dicho soporte de datos puede ser una hoja de papel o, preferiblemente, un medio
20 legible por ordenador. Tal y como se usa en este documento, "un medio legible por ordenador" puede ser cualquier aparato que puede incluir, almacenar, comunicar, propagar o transportar los resultados de la determinación del método de la invención. El medio puede ser un sistema electrónico, magnético, óptico, electromagnético, infrarrojo, o semiconductor (o aparato o dispositivo) o un medio de propagación.

Los métodos de la presente invención pueden ser implementados por un ordenador. Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención se refiere a un método implementado por ordenador, en el que el método es cualquiera de los métodos descritos en este documento o cualquier combinación de los mismos. Se hace notar que cualquier programa de ordenador
30 capaz de implementar cualquiera de los métodos de la presente invención o el programa usado para poner en práctica cualquiera de estos métodos o cualquier combinación de los mismos, también forma parte de la presente invención.

También se incluye cualquier dispositivo o aparato que comprende, o que lleva, un programa
35 de ordenador para la aplicación de cualquiera de los métodos de la presente invención o cualquier combinación que, por lo tanto, se incluye como parte de la presente memoria descriptiva.

Un método in vitro de control de la enfermedad y / o seguimiento de la capacidad de respuesta a un tratamiento en un sujeto que tiene, o se sospecha que tiene, una enfermedad autoinmune y / o enfermedad inflamatoria y métodos relacionados con los mismos

En otro aspecto, la invención se refiere a un método in vitro de control de la enfermedad y / o seguimiento de la capacidad de respuesta a un tratamiento en un sujeto que tiene, o se sospecha que tiene, una enfermedad autoinmune y / o enfermedad inflamatoria, comprendiendo dicho método los pasos a) y b) del primer aspecto de la invención. En una realización particular, un aumento de los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgG y / o los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgM y / o el cociente entre los niveles de anticuerpos anti-CD26 / niveles de anticuerpos IgG totales en la muestra sujeto en relación con el valor de referencia es indicativo de la enfermedad.

En un aspecto relacionado, la invención se refiere a un método in vitro para la clasificación de un sujeto como respondedor a un tratamiento para una enfermedad autoinmune y / o inflamatoria, comprendiendo dicho método las etapas a) y b) del primer aspecto de la invención. En una realización particular, un aumento de los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgG y / o los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgM y / o el cociente entre los niveles de anticuerpos anti-CD26 de IgG / niveles de anticuerpos IgG totales / total en la muestra del sujeto en relación a un valor de referencia es indicativo de falta de respuesta.

Para cualquiera de los aspectos anteriormente mencionados, dicho valor de referencia puede corresponder a un valor de referencia (por ejemplo, los niveles medios de anticuerpos anti-CD26 o sus cocientes) en sujetos sanos. También puede corresponder a los niveles de anticuerpos anti-CD26 determinados en una muestra apropiada aislada de un paciente en un momento anterior en el tiempo, como podría ser cercano al diagnóstico y / o antes del tratamiento.

Las características y formas de realización preferidas son tal cual se han definido anteriormente para otros aspectos de la invención.

Un método de tratamiento de un sujeto y usos médicos secundarios de la invención

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad autoinmune y / o una enfermedad inflamatoria,

comprendiendo dicho método la identificación del sujeto a ser tratado por un método que comprende las etapas a) y b) del primer aspecto de la invención

y

c) tratamiento de dicho sujeto que padece o se sospecha que padece de una enfermedad autoinmune y / o enfermedad inflamatoria.

En una realización particular, un aumento de cualquiera de los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgG y / o los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgM y / o el cociente entre los niveles de anticuerpos anti-CD26 de IgG / niveles de anticuerpos IgG totales en la muestra de un sujeto con respecto a un valor de referencia es indicativo de enfermedad.

Dicho valor de referencia puede corresponder a un valor de referencia (por ejemplo, el nivel medio de anticuerpos anti-CD26 pertinente o su cociente) en sujetos sanos.

Dichas terapias pueden incluir uno o más de los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME); antiinflamatorios no esteroideos (AINEs); terapias biológicas, que pueden dividirse como biológicos anti-TNF alfa (por ejemplo, el adalimumab, pegol cetolizumab, etanercept, golimumab o infliximab) y biológicos no-TNF alfa (por ejemplo, anticuerpos anti-CD20, anticuerpos anti-IL6R o proteínas de fusión CTLA4-Fc); corticosteroides; y los inhibidores de quinasas JAK (tales como tofacitinib).

Los AINEs incluyendo, pero sin limitarse a los inhibidores de la Cox-2, diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno, celecoxib, ácido mefenámico, etoricoxib, indometacina y aspirina. Los corticosteroides incluyen, pero no se limitan a la triamcinolona, cortisona, prednisona y metilprednisolona. Los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME), incluyen, pero no se limitan a la auranofina, cloroquina, ciclosporina, ciclofosfamida, preparaciones de oro, sulfato de hidroxiclороquina, leflunomida, metotrexato, penicilamina, aurotiomalato de sodio y sulfasalazina. Ejemplos ilustrativos, no limitantes de anticuerpos terapéuticos utilizados para enfermedades autoinmunes y / o enfermedades inflamatorias se proporcionan en la Tabla 1 de Chan y Carter, en Nature Rev Immunol, 2010; 10: 301-315.

Singh y cols, Arthritis & Rheumatol 2016; 68: 1-16 proporciona una directriz para el tratamiento de la AR del Colegio Americano de Reumatología. La Tabla 1 presenta un resumen de los tratamientos terapéuticos actuales para la AR. En particular, las recomendaciones de tratamiento para los pacientes con AR sintomática temprana se proporcionan en la tabla de la página 8.

En una realización particular, dicho método de tratamiento comprende el uso de uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en:

- i. FARMES, preferiblemente metotrexato, y / o leflunomida;
- ii. agentes anti-TNF alfa;
- iii. agentes anti-CD20;
- iv. agentes anti-IL6R; y
- 5 v. proteínas de fusión CTLA4-Fc, como abatacept.

En un aspecto relacionado, la invención se refiere a un fármaco seleccionado de la lista que consiste en:

- i. FARMES;
- 10 ii. agentes anti-TNF alfa;
- iii. agentes anti-CD20; y
- iv. agentes anti-IL6R y / o proteínas de fusión CTLA4-Fc,

para uso en un método de tratamiento de un sujeto que padece o se sospecha que padece una enfermedad autoinmune y / o una enfermedad inflamatoria, que ha sido seleccionado usando un método de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en este documento.

Las características y formas de realización preferidas son tal cual se han definido anteriormente para otros aspectos de la invención.

20

Un método in vitro para determinar la etapa de la progresión de una enfermedad autoinmune y / o inflamatoria en un sujeto y métodos relacionados con los mismos

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar la etapa de la progresión de una enfermedad autoinmune y / o enfermedad inflamatoria en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas a) y b) del primer aspecto de la invención.

En un aspecto relacionado, la invención se refiere a un método *in vitro* de determinación de un tratamiento para un sujeto que tiene una enfermedad autoinmune y / o inflamatoria de acuerdo con su etapa de progresión que comprende las etapas a) y b) del primer aspecto de la invención .

En una realización particular de cualquiera de los aspectos anteriores, un aumento de cualquiera de los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgG y / o los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgM y / o el cociente entre los niveles de anticuerpos anti-CD26 de IgG / niveles de anticuerpos IgG totales en la muestra sujeto con respecto a un valor de referencia está asociado con una etapa temprana de la progresión.

Además, para cualquiera de los aspectos anteriormente mencionados, dicho valor de referencia puede corresponder a un valor de referencia (por ejemplo, los niveles medios de anticuerpos anti-CD26 pertinentes o el cociente) en sujetos sanos. También puede
 5 corresponder a un valor de referencia (por ejemplo, los niveles medios de anticuerpos anti-CD26 pertinentes o el cociente) en pacientes que tienen o se sospecha que tienen una enfermedad anti-inflamatoria y / o autoinmune, preferiblemente una enfermedad reumática inflamatoria, más preferiblemente la misma enfermedad inflamatoria y / o autoinmune.

- 10 Las características y formas de realización preferidas son tal cual se han definido anteriormente para otros aspectos de la invención.

En una realización preferida, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, se refiere a un método *in vitro* para
 15 determinar la etapa de progresión de una enfermedad autoinmune y / o enfermedad inflamatoria en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas a) y b) del primer aspecto,

donde un aumento de los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgG en la muestra del sujeto con respecto a un valor de referencia está asociado con la etapa temprana de la progresión;

20 donde dicho valor de referencia se corresponde a los niveles medios de anticuerpos anti-CD26 IgG en sujetos sanos.

En otra realización preferida, opcionalmente en combinación con cualquiera de las
 25 realizaciones descritas en el presente documento, se refiere a un método *in vitro* de determinación de un tratamiento para un sujeto que tiene una enfermedad autoinmune y / o inflamatoria de acuerdo con su etapa de progresión que comprende las etapas a) y b) del primer aspecto,

30 donde un aumento de los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgG en la muestra del sujeto con respecto a un valor de referencia es indicativo de la etapa temprana de la progresión;

donde el valor de referencia corresponde a los niveles medios de anticuerpos anti-CD26 IgG en sujetos sanos.

35 ***El uso de los niveles determinados in vitro de anticuerpos anti-CD26 como biomarcadores de una enfermedad autoinmune y / o enfermedad inflamatoria***

El uso de los niveles determinados *in vitro* de anticuerpos anti-CD26 IgG y / o los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgM y / o el cociente entre los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgG / niveles de anticuerpos IgG totales, opcionalmente en combinación con los niveles determinados *in vitro* de anticuerpos anti-CD26 IgA, en una muestra de un sujeto para la detección, diagnóstico y / o seguimiento de una enfermedad autoinmune y / o una enfermedad inflamatoria; y / o para controlar la eficacia de un tratamiento en una enfermedad autoinmune y / o una enfermedad inflamatoria.

- 10 Las características y formas de realización preferidas son tal cual se han definido anteriormente para otros aspectos de la invención.

Kit y usos del mismo

- 15 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit que comprende los reactivos para la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 de acuerdo con la etapa a) del primer aspecto de la invención.

En algunas realizaciones, el kit incluye un polipéptido de sCD26 purificado o sintetizado o un fragmento antigénico del mismo (que puede ser marcado o no) y uno o más reactivos auxiliares. En otras realizaciones, el kit incluye una célula huésped adecuada (por ejemplo una célula de mamífero) que expresa CD26 y uno o más reactivos auxiliares. CD26, incluyendo sCD26 y fragmentos de la misma se han descrito en el primer aspecto de la invención. En estas realizaciones, cuando se cuantifican los niveles de anticuerpos anti-CD26 típicamente se emplea sCD26 o una célula que expresa CD26 para el propósito de captura y un anticuerpo secundario para el propósito de detección. En otras realizaciones adicionales, se cuantifican los niveles de inmunoglobulina anti-CD26 producidos por células que la expresan, por ejemplo, por inmunohistoquímica (IHC) o citometría, el kit típicamente incluye sCD26 marcada para el propósito de detección y uno o más reactivos auxiliares.

30

Kit anti-CD26 isotipo IgG

En una realización particular, dicho kit comprende reactivos para la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 del isotipo IgG en una muestra de un sujeto que contiene el anticuerpo, en el que dicho kit comprende:

35

- a) un reactivo para determinar los niveles de anticuerpos anti-CD26 del isotipo IgG;

b) opcionalmente, instrucciones para el uso de dicho reactivo en la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 del isotipo IgG en una muestra de un sujeto.

Preferiblemente, a) corresponde a:

5

- i. CD26, un fragmento antigénico de la misma o una célula que expresa cualquiera de los mismos;
- ii. un reactivo para determinar los niveles de anticuerpos anti-CD26 del isotipo IgG capturados (por ejemplo, un anticuerpo anti-IgG marcado)

10

En una realización preferida, dicho kit comprende además:

- c) un reactivo para determinar los niveles de anticuerpos anti-CD26 del isotipo IgA y / o el isotipo IgM;
- d) opcionalmente, instrucciones para el uso de dicho reactivo en la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 del isotipo IgA y / o el isotipo IgM en dicha muestra conteniendo el anticuerpo.

15

Preferiblemente, c) corresponde a:

- iii. un reactivo para determinar los niveles de anticuerpos anti-CD26 del isotipo IgA y / o del isotipo IgM capturados (por ejemplo, un anticuerpo anti-IgA marcado y / o un anticuerpo anti-IgM marcado).

20

Kit anti-CD26 isotipo IgM

En otra realización particular, dicho kit comprende reactivos para la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 del isotipo IgM en una muestra de un sujeto que contiene el anticuerpo, en el que dicho kit comprende:

25

- a) un reactivo para determinar los niveles de anticuerpos anti-CD26 del isotipo IgM;
- b) opcionalmente, instrucciones para el uso de dicho reactivo en la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 niveles del isotipo IgM en una muestra de un sujeto.

30

Preferiblemente, a) corresponde a:

- i. CD26, un fragmento antigénico de la misma o una célula que expresa cualquiera de los mismos;
- ii. un reactivo para la determinación de los niveles de anticuerpo anti-CD26 del isotipo IgM capturados (por ejemplo, un anticuerpo anti-IgM marcado);

35

En una realización preferida, dicho kit comprende además:

c) un reactivo para determinar los niveles de anticuerpos anti-CD26 del isotipo IgA y / o del isotipo;

d) opcionalmente, instrucciones para el uso de dicho reactivo en la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 del isotipo IgA y / o del isotipo IgG en dicha muestra conteniendo el anticuerpo.

Preferiblemente, c) corresponde a:

iii. un reactivo para determinar los niveles de anticuerpos anti-CD26 del isotipo IgA y / o del isotipo IgG (por ejemplo, un anticuerpo anti-IgA marcado y / o un anticuerpo anti-IgG marcado).

Preferiblemente, dicho kit comprende un soporte sólido o una superficie revestida con i). El soporte sólido puede incluir cualquier soporte conocido en el estado de la técnica en la que una proteína de la presente descripción pueda ser inmovilizado. En algunas formas de realización, dichos soportes sólidos son placas de microtitulación, portaobjetos (por ejemplo, portaobjetos de vidrio), chips (por ejemplo, chips de proteínas, chips biosensores, tales como chips de Biacore), cartuchos de microfluidos, cubetas, perlas (por ejemplo, perlas magnéticas, perlas xMAP®) o resinas.

Dicho reactivo para la determinación de los niveles de anticuerpos de los isotipos IgM, IgG y / o IgA puede ser un anticuerpo secundario. Los anticuerpos secundarios en la presente invención pueden incluir, por ejemplo, un anticuerpo anti-IgA humana, un anticuerpo anti-IgG humana, o un anticuerpo IgM anti-humana. Los anticuerpos secundarios pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales. Los anticuerpos secundarios pueden ser obtenidos de cualquier mamífero, incluyendo ratón, rata, hámster, cabra, camello, pollo, conejo, y otros. Los anticuerpos secundarios se pueden conjugar con cualquier medio de detección adecuado, tales como enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina (AP), luciferasa, y similares) o colorantes (por ejemplo, tintes colorimétricos, colorantes fluorescentes, colorantes por transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), colorantes FRET con resolución temporal (TR), y similares). En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario es un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG humana (o anti-IgM humana o anti-IgA humana dependiendo, respectivamente, del isotipo a determinar), conjugado con HRP.

Cualquiera de las realizaciones anteriores, puede comprender además:

e) un reactivo para determinar los niveles de anticuerpos totales de los isotipos IgM, IgG y / o IgA;

f) opcionalmente, instrucciones para el uso de dicho reactivo en la determinación de los niveles de anticuerpos totales de los isotipos IgM, IgG y / o IgA en una muestra conteniendo dichos anticuerpos.

5 Preferiblemente, e) corresponde a:

iv. un reactivo para la captura de anticuerpos de los isotipos IgM, IgG y / o IgA (por ejemplo, un anticuerpo anti-IgM, anti-IgG y / o IgA)

v. un reactivo para determinar los niveles de anticuerpos capturados de los isotipos IgM, IgG y / o IgA (por ejemplo, un anticuerpo marcado anti-IgM, anti-IgG y / o anti-IgA);

10

Típicamente, el reactivo en **iv)** y **v)** son anticuerpos policlonales contra el isotipo correspondiente procedentes de diferentes especies animales (por ejemplo, un anticuerpo policlonal anti-IgG humana de conejo y un anticuerpo policlonal anti-IgG humana de cabra, respectivamente). Estos también pueden ser anticuerpos monoclonales, con la condición de
15 que éstos se unen a diferentes epítomos y no hay interferencia estérica.

Preferiblemente, dicho kit comprende una superficie o soporte sólido, que se recubre con **iv)**. Esta superficie puede o no ser la misma que está revestida con **i)**. Preferiblemente, la superficie revestida con **i)** y la superficie recubierta con **iv)** son superficies separadas.

20

Los reactivos auxiliares usados típicamente en un inmunoensayo, tales como un inmunoensayo en soporte sólido, pueden incluir, por ejemplo, un tampón de inmovilización, un reactivo de inmovilización, un tampón de dilución, un anticuerpo secundario, un reactivo de detección, un tampón de bloqueo, un tampón de lavado, un tampón de detección, un
25 reactivo de detección, una solución de parada, un tampón de lavado del sistema, y una solución de limpieza del sistema que son bien conocidos por una persona experta en la técnica.

Las características y formas de realización preferidas son tal cual se han definido
30 anteriormente para otros aspectos de la invención. En particular, un ejemplo de inmunoensayo para determinar los niveles de anticuerpos anti-CD26 se proporciona en el marco del primer aspecto de la invención.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un kit del aspecto anterior para la
35 detección, diagnóstico y / o seguimiento de una enfermedad autoinmune y / o una enfermedad inflamatoria; y / o para el seguimiento de la eficacia de un tratamiento en una muestra de un sujeto que contiene el anticuerpo.

Las características y formas de realización preferidas son tal cual se han definido anteriormente para otros aspectos de la invención.

5 ***Los niveles totales de IgA como biomarcador para la detección, diagnóstico, seguimiento de una enfermedad inflamatoria y / o autoinmune y aspectos relacionados.***

Tal como se establece en el Ejemplo 5, los niveles de anticuerpos IgA totales, han demostrado un alto valor de discriminación entre los donantes sanos y toda la cohorte de
10 pacientes tratados con diferentes terapias (véase la Figura 15, el AUC de 0,979) y entre los donantes sanos y los pacientes sometidos a FARMES pero no terapia biológica (Figura 16, AUC: 0,947).

En consecuencia, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método *in vitro* para el
15 cribado, para la obtención de datos útiles para el diagnóstico, para el diagnóstico o para el seguimiento de un sujeto que tiene, o se sospecha que tiene, una enfermedad autoinmune y / o una enfermedad inflamatoria que comprende los pasos siguientes:

- a) determinación de los niveles de anticuerpos totales del isotipo IgA (niveles totales de anticuerpos IgA) en una muestra de un sujeto que contiene el anticuerpo;
- 20 b) comparación de los niveles en dicha muestra conteniendo el anticuerpo con un valor de referencia.

En una realización particular, un aumento de los niveles totales de anticuerpos del isotipo IgA en la muestra del sujeto con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de
25 enfermedad.

Dicho valor de referencia puede corresponder a un valor de referencia para los niveles totales de anticuerpos del isotipo IgA (por ejemplo, la media o la mediana de estos niveles o de un valor de corte calculado) en sujetos sanos. También puede corresponder a dichos niveles de
30 anticuerpos IgA totales determinado en una muestra apropiada de un paciente en un momento anterior en el tiempo, tal como cercano al diagnóstico y / o antes del tratamiento.

Los niveles totales de anticuerpos IgA (por ejemplo, los niveles totales de anticuerpos IgA humanos) pueden determinarse por cualquier método bien conocido en la técnica. Estos son
35 típicamente cuantificados mediante el uso de un inmunoensayo incluyendo, en particular, un inmunoensayo en un soporte sólido tal y como se describe en detalle en el primer aspecto de

la invención, en el que el soporte sólido está recubierto con un anticuerpo anti-IgA (por ejemplo, un anticuerpo IgA anti-humana) .

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad autoinmune y / o una enfermedad inflamatoria, comprendiendo dicho método la identificación del sujeto a ser tratado por un método que comprende las etapas de:

- a) determinación de los niveles de anticuerpos totales del isotipo IgA (niveles totales de anticuerpos IgA) en una muestra del sujeto que contenga dichos anticuerpos;
- b) comparación de los niveles de anticuerpo en dicha muestra con un valor de referencia;
- y
- c) tratamiento de dicho sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad autoinmune y / o una enfermedad inflamatoria.

En una realización particular, un aumento de los niveles totales de anticuerpos del isotipo IgA en la muestra del sujeto con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de enfermedad.

Dicho valor de referencia puede corresponder al valor de referencia del nivel total de anticuerpos IgA (por ejemplo, la media o la mediana de los niveles o de un valor de corte) en sujetos sanos.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit que comprende los reactivos para la determinación de los niveles totales de anticuerpos del isotipo IgA en una muestra de un sujeto que contenga dicho anticuerpo:

- a) un reactivo para la determinación de los niveles de anticuerpos totales del isotipo IgA;
- b) opcionalmente, instrucciones para el uso de dicho reactivo en la determinación de los niveles totales de anticuerpos del isotipo IgA en una muestra de un sujeto que contenga dicho anticuerpo.

En una realización particular, dicho kit comprende además:

- c) un reactivo para la determinación de los niveles de un anticuerpo anti-CD26 del isotipo IgG;
- d) opcionalmente, instrucciones para el uso de dicho reactivo en la determinación de los niveles de un anticuerpo anti-CD26 del isotipo IgG en una muestra de un sujeto que contiene el anticuerpo.

En otra realización particular, opcionalmente en combinación con la realización anterior, dicho kit comprende además:

e) un reactivo para determinar los niveles de anticuerpo anti-CD26 del isotipo IgA y / o del isotipo IgM;

- 5 f) opcionalmente, instrucciones para el uso de dicho reactivo en la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 del isotipo IgA y / o del isotipo IgM.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un kit para el cribado, diagnóstico y / o seguimiento de una enfermedad autoinmune y / o una enfermedad inflamatoria; y / o
10 para el seguimiento de la eficacia de un tratamiento en una muestra de un sujeto que contiene anticuerpo, en el que dicho kit es tal como se describe en el aspecto anterior.

Las realizaciones preferidas y las características de cualquiera de estos aspectos son como se describen anteriormente para los otros aspectos de la invención.

15 Se contempla que cualquier realización descrita en esta memoria con respecto a un aspecto de la invención se aplica también a otros aspectos de la invención, y viceversa, más específicamente se puede implementar en relación con cualquier método, kit, y el uso de la invención aquí descrita. Se entenderá que las realizaciones particulares descritas en el
20 presente documento se muestran a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención. Las principales características de esta invención se pueden emplear en diversas realizaciones sin apartarse del alcance de la invención. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar usando no más que experimentación de rutina, numerosos equivalentes a los procedimientos específicos descritos en el presente
25 documento. Tales equivalentes se consideran dentro del alcance de esta invención y están cubiertos por las reivindicaciones.

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en las especificaciones son indicativas del nivel de experiencia de los expertos en la técnica a la que pertenece esta
30 invención. Todas las publicaciones y solicitudes de patentes se incorporan aquí por referencia en la misma medida como si cada publicación o solicitud de patente individual se indicara específica e individualmente para ser incorporada por referencia.

El uso de la palabra "un" o "una" puede significar "uno", pero también es consistente con el
35 significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno". El uso del término "otro" también puede referirse a uno o más. El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa

para significar "y / o" a menos que se indique expresamente para referirse a alternativas solamente o las alternativas son mutuamente excluyentes.

Tal como se utiliza en esta memoria y reivindicación (s), las palabras "que comprende" (y cualquier forma de "que comprende", como "comprenden" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de tener, como "tienen" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de incluir, tales como "incluye" e "incluir") o "que contiene" (y cualquier forma de contener, como "contiene" y "contienen") son inclusivos y no excluyen elementos adicionales no citados, o etapas del procedimiento. El término "comprende" también abarca y da a conocer expresamente los términos "consiste en" y "consiste esencialmente en". Tal como se utiliza aquí, la frase "que consiste esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a los materiales o pasos especificados y aquellos que no afectan materialmente la característica (s) básica y novedosa de la invención reivindicada. Tal como se utiliza aquí, la frase "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa, o ingrediente no especificado en la solicitud con la excepción de, por ejemplo, las impurezas normalmente asociadas con el elemento o limitación.

El término "o combinaciones de los mismos", como se usa aquí, se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos enumerados precedentes del término. Por ejemplo, "A, B, C, o combinaciones de los mismos" pretende incluir al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, ACB, ACB, ACB, BAC, o CAB. Siguiendo con este ejemplo, se incluyen expresamente las combinaciones que contienen repeticiones de uno o más elementos o términos, tales como BB, AAA, AB, BBC, AAABCCCC, CBAAAA, CABABB, y así sucesivamente. El experto en la materia comprenderá que normalmente no hay ningún límite en el número de elementos o términos en cualquier combinación, menos otros evidentes por el contexto.

Una persona experta en la técnica generalmente entiende que un valor incluye la desviación estándar del error para el dispositivo o método que se emplea para determinar el valor. Esto puede enfatizarse en el presente documento por el uso de palabras de aproximación tales como, sin limitación, "sobre", "alrededor de", "aproximadamente", se refiere a una condición así modificada se entiende que no necesariamente es absoluta o perfecta, pero sería considerada lo suficientemente cercana por los expertos en la técnica para garantizar que designa a que dicha condición está presente. La medida en que la descripción puede variar dependerá de lo grande que un cambio puede ser establecido y aun así expertos en la técnica reconocen que la característica modificada sigue teniendo las características y capacidades requeridas de la función sin modificar. En general, pero sujeto a la discusión anterior, un valor numérico en este documento que es modificado por una palabra de

aproximación como "aproximadamente" puede variar con respecto al valor declarado por ± 1 , 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15%. Preferiblemente, el término "aproximadamente" significa exactamente el valor indicado ($\pm 0\%$).

- 5 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la misma.

EJEMPLOS

10 *Ejemplo 1.- Material y Métodos*

Diseño del estudio

110 pacientes del Servicio de Reumatología (Hospital Meixoeiro-CHUVI) fueron reclutados en un estudio transversal de casos y controles. Los pacientes cumplieron los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR) / EULAR de 2010, Aletaha D y cols, 2010; Arthritis
 15 Rheum 62: 2569-2581) y tratados con diferentes terapias, incluyendo terapias biológicas (BT). El único criterio de exclusión fue la decisión del paciente de no ser incluido en el estudio. Un grupo de 25 donantes sanos también fue reclutado. Todos los procedimientos descritos se realizaron de acuerdo con las prácticas éticas clínicas de las administraciones españolas y europeas y aprobados por el comité de ética local. Se obtuvo consentimiento
 20 informado escrito de todos los participantes.

La actividad de la enfermedad se evaluó previamente en este grupo de pacientes empleando el índice DAS-28, que tiene en cuenta el número de articulaciones dolorosas (TJC), articulaciones inflamadas (SJC), velocidad de sedimentación globular (VSG) y la evaluación
 25 global del paciente (PGA) de actividad de la enfermedad, anotado por una escala de clasificación numérica (NRS 0-100). La velocidad de sedimentación globular (VSG), proteína C-reactiva (PCR), los niveles de hemoglobina y la concentración de plaquetas también se registraron como marcadores de actividad de la AR. El índice DAS-28 y la forma de determinarlo es algo bien sabido para un experto en la técnica, véase por ejemplo J. S.
 30 Smolen y cols. Arthritis Rheum 1995, 38: 38-43, cuyo contenido se incluye aquí como referencia. Todos los pacientes completaron también el HAQ (Cuestionario de evaluación de la salud de Stanford: Fries J, Spitz PW, Young DY. The dimensions of health outcomes: the health assessment questionnaire, disability and pain scales, J Rheumatol 1982, 9: 789-93), el cual es una evaluación propia del estado funcional (discapacidad). Los resultados en los
 35 parámetros evaluados de actividad de la enfermedad han sido publicados con anterioridad por los inventores (Cordero OJ y cols, PLoS One 2015, 10:E0131992) y el contenido de este documento se incluye como referencia.

Definición de diferentes grupos de pacientes en función de la terapia.

Los pacientes estudiados fueron clasificados en diferentes grupos de acuerdo a las terapias que estaban recibiendo, las cuales pueden tener diferentes efectos sobre los valores de anticuerpos. La cohorte se dividió en cuatro grupos de acuerdo con el mecanismo de acción de las diferentes terapias:

a) fármacos anti-reumáticos modificadores de la enfermedad (FARMEs, metotrexato y / o leflunomida);

b) agentes anti-TNF-alfa agentes (adalimumab, etanercept, infliximab, golimumab),

c) anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CD20 (rituximab), y

d) mAb anti-IL6R (tocilizumab) o Ig-CTLA4 (abatacept). En este último subgrupo ambos tratamientos mostraron una respuesta inmunológica similar, por lo que los resultados de los pacientes fueron agrupados.

Historial de tabaquismo

El historial de tabaquismo de los pacientes se evaluó en el momento de la inclusión. Los fumadores actuales fueron los que comunicaron tabaquismo activo. Los ex-fumadores fueron todos aquellos pacientes que habían dejado de fumar antes del primer examen al momento de su inclusión. Los no fumadores fueron aquellos sin antecedentes de tabaquismo en cualquier momento.

Muestras biológicas

Para la recolección de suero, se extrajo sangre venosa periférica en tubos BD SST™ II *Advance*, se dejó coagular a temperatura ambiente y se centrifugó a 2000 x g durante 15 min.

El suero fue almacenado a -80 ° C hasta su uso. Se recogieron células sanguíneas usando tubos TransFix® Vacuum Blood Collection (Cytomark, Buckingham, Reino Unido) y se almacenaron a 4 ° C hasta su uso.

Determinación de la actividad enzimática DPP-IV y la proteína DC26 soluble (sCD26)

Ambas técnicas han sido descritas anteriormente (Cordero OJ y cols, Plos One 2015; 10(7):e0131992, Cuchacovich M y cols, Clin Exp Rheumatol 2001; 19:673-80, Ellingsen T y cols, Scand J Immunol 2007; 66:451-7]. Dado que estudios anteriores [Cordero OJ y cols, Immunobiology 1997; 197: 522-33, De Chiara L y cols, Dis Markers 2009; 27:311-6. doi: 10.3233/DMA-2009-0679, Lambeir AM y cols, Crit Rev Clin Lab Sci 2003; 40:209-94) han demostrado unas pequeñas diferencias no estadísticamente significativas en los niveles de sCD26 y de actividad enzimática DPPIV en función del sexo o la edad, los valores de los controles y los pacientes con AR no fueron emparejados según estos dos parámetros.

Determinación de inmunoglobulinas totales y autoanticuerpos anti-CD26 mediante ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas.

La concentración de IgA, IgG e IgM totales así como de autoanticuerpos anti-CD26/DPPIV en el suero de los pacientes se determinó mediante ELISA usando placas de cultivo 96 pocillos recubiertos con rDPP-IV (0,5 µg / mL) (Sigma-Aldrich España o R&D Systems, EE.UU.) o con anticuerpo policlonal de conejo anti-IgA, anti-IgG y anti-IgM humanas (2 µg / mL) (DakoCytomation, Dinamarca) preparado en PBS pH 7,4 y se bloquearon durante la noche con PBS 0,5% BSA. Las placas se incubaron con diferentes diluciones de suero durante 1 h a 37°C y después se lavaron cuatro veces con PBS 0,05% Tween20. Anticuerpos de cabra anti-IgM (específicos para cadena-µ), anti-IgG (específicos para Fab) y anti-IgA (específicos para cadena-α) humana (todos de Sigma-Aldrich) fueron empleados para detectar los anticuerpos capturados junto con el sustrato estándar OPD (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia a 450 nm se registró usando un lector de placas BioRad (BioRad, Madrid, España). Las concentraciones se calcularon a partir de curvas de calibración construidas con IgA, IgG o IgM humanas purificadas.

Prueba de ACPA

Se empleó el test Elia[™] CCP (Thermo Scientific / Phadia, Suecia) para analizar si los autoanticuerpos anti-CD26 en RA eran anticuerpos contra CD26 citrulinado. Brevemente, se utilizó el ensayo para unir los anticuerpos anti-CCP del suero de los pacientes a la placa conteniendo antígenos CPP, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El suero restante se recupera en forma de fracción negativa para ACPA. Después de lavar la placa Elia-CCP para evitar uniones inespecíficas, los ACPA se eluyeron de la placa con tampón de elución (0,1 M Gly-HCl pH 2,7) y éste fue neutralizado con 1 M Tris-HCl pH 9 para obtener la fracción positiva para ACPA. Ambas fracciones fueron ahora evaluadas mediante el ELISA anti-CD26 descrito anteriormente. De la misma manera, este último ELISA se utilizó para obtener una fracción negativa para anticuerpos anti-CD26 (recuperación del suero de pacientes después de la captura de anticuerpos a placas recubiertas con CD26) y una fracción de positiva para anticuerpos anti-CD26 (obtenida después de lavar y eluir la placa con los anticuerpos capturados); las dos fracciones se analizaron mediante la prueba de Elia[™] CCP.

Se eligieron los sueros de tres pacientes con AR que muestran altos niveles de anticuerpos anti-CD26 del isotipo IgG y los de tres donantes sanos. En todos los ensayos de ELISA se emplearon únicamente reactivos para la detección de anticuerpos del isotipo IgG (descrito anteriormente).

Análisis estadístico

Todos los análisis fueron paramétricos. La prueba de ANOVA se realizó para comparar las variables entre los cuatro grupos de pacientes con o sin terapias biológicas. Se utilizó la prueba post-hoc de Scheffé para las variables con varianzas homogéneas y la prueba post-hoc C de Dunnett para variables sin varianzas homogéneas. Se realizó la prueba t de Dunnett para comparar cada grupo con un grupo de control, ya sea el grupo sin tratamiento biológico o el grupo de donantes sanos. También se utilizó la prueba t de Student para comparar variables entre dos grupos. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SPSS versión 20 (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.).

Ejemplo 2.- Niveles de autoanticuerpos anti-CD26 / DPP-IV y su correlación con la actividad de la DPP-IV en suero y las concentraciones de sCD26 en la cohorte de donantes sanos

Los autoanticuerpos contra CD26 han sido descritos en donantes sanos y se ha propuesto su participación en el aclaramiento de este antígeno mediante su secreción en la bilis (Cuchacovich M y cols. Clin Exp Rheumatol 2001; 19: 673-80). Con nuestro ELISA, los títulos medidos en suero (n = 25) para las concentraciones totales de inmunoglobulina para los tres isotipos en estudio fueron coherentes con los valores esperados, $2,37 \pm 1,24$ mg / ml para IgM, $2,28 \pm 0,27$ mg / ml para IgA y $12,28 \pm 2,79$ mg / ml para IgG (González-Quintela A y cols. Clin Exp Immunol 2007; 151:42-50). La media de los títulos en suero de anticuerpos anti-CD26 son también bastante similares a los publicados anteriormente (Snir O y cols. Arthritis Rheum 2010; 62: 44-52; DOI: 10.1002/art.25036), $13,51 \pm 5,62$ µg / mL para IgM, $1,28 \pm 0,27$ µg / mL para IgA y $2,14 \pm 0,64$ µg / mL para IgG, siendo los valores actuales ligeramente más bajos para los isotipos IgM e IgA en comparación con resultados previos publicados por Cuchacovich y cols (Cuchacovich M et al Clin Exp Rheumatol 2001; 19:673-80) probablemente debido al hecho de que se utilizó antígeno humano recombinante en lugar de CD26 purificada a partir de suero humano. Sin embargo, comparando los cocientes entre autoanticuerpos anti-CD26 / isotipo inmunoglobulina total publicados por Cuchacovich y cols. con nuestros datos (7,12 para IgM, 0,57 para IgA y 0,19 para IgG), nuestros resultados son más coherentes con los valores esperados para los títulos de inmunoglobulina total.

Es importante destacar que ninguno de los títulos séricos mostrados, incluyendo los niveles reducidos de autoanticuerpos anti-CD26 del isotipo IgA, ni sus cocientes, correlacionan con la actividad enzimática DPP-IV o la concentración de sCD26 sérica en esta cohorte de donantes sanos, lo que sugiere que si su función está relacionada con el aclaramiento de antígeno, su efecto sobre los niveles de sCD26 es indetectable.

Ejemplo 3.- Niveles totales de anticuerpos y autoanticuerpos anti-CD26 / DPP-IV en pacientes con AR siguiendo diferentes tratamientos

3.1 Niveles totales de anticuerpos y autoanticuerpos anti-CD26 / DPP-IV en la cohorte completa

Al analizar la cohorte completa de pacientes con AR (n = 106) hemos encontrado niveles más elevados tanto de inmunoglobulinas totales como de autoanticuerpos anti-CD26. Las concentraciones totales de inmunoglobulina para los tres isotipos son $4,33 \pm 3,79$ mg / mL para IgM, $5,61 \pm 1,77$ mg / mL para IgA y $21,81 \pm 15,35$ mg / mL para IgG (Lambeir AM et al Crit Rev Clin Lab Sci 2003; 40: 209-94). Las concentraciones de autoanticuerpos anti-CD26 son $27,97 \pm 19,09$ µg / mL para IgM, $2,01 \pm 1,34$ µg / mL para IgA y $5,87 \pm 3,13$ µg / mL para IgG, y los cocientes auto-anticuerpo / isotipo total son 17,10 para IgM, 0,43 para IgA y 0,75 para IgG. Así pues, aunque todos los valores de inmunoglobulina total aumentaron dos veces en general, es interesante observar que los cocientes para los isotipos IgM y en particular IgA son más bajos en comparación con donantes sanos, mientras que este no fue el caso para el isotipo IgG, el cual es ligeramente superior y significativamente diferente en comparación con donantes sanos (p = 0,03; prueba de ANOVA), además de todos los valores promedio para los títulos de inmunoglobulina total y autoanticuerpos anti-CD26 de los tres isotipos (p < 0,001 para la mayoría de ellos con la prueba t de Student) . Estos resultados apuntan a la utilidad de los títulos de anticuerpos anti-CD26 como un marcador biológico de la AR.

3.2 Niveles de anticuerpos totales y anti-CD26 / DPP-IV en función de la terapia

El grupo bajo terapia con anti-CD20 puede servir como control. Los anticuerpos monoclonales terapéuticos dirigidos contra el antígeno CD20 en las células B se utilizan con éxito en la clínica para la reducción de estas células B en el tratamiento de formas de cáncer y enfermedades autoinmunes, ya que por su mecanismo de acción reducen los niveles de inmunoglobulinas en general. La terapia anti-CD20 ha demostrado reducir los niveles de IgG total y en particular de IgM, tal y como se esperaba, pero no tuvo ningún efecto sobre la IgA total (Tabla 2) en comparación con el grupo sin tratamiento biológico. La disminución observada, sin embargo, no alcanza los niveles de anticuerpos observados en donantes sanos. Por el contrario, se muestra que las otras terapias biológicas elevan los niveles totales de los isotipos IgG e IgM, siendo el grupo recibiendo anti-IL6R / Ig-CTLA4 el único que muestra un nivel ligeramente más bajo de IgA (Tabla 2).

Sin embargo, el efecto de los diferentes tratamientos sobre los niveles de autoanticuerpos anti-CD26 fue diferente. El isotipo IgG no fue afectado por ninguna de las terapias; el

tratamiento con anti-CD20 reduce fuertemente sólo el isotipo IgM y finalmente el isotipo IgA se ve afectado tanto por el tratamiento con anti-TNF-alfa como con terapias anti-IL6R / Ig-CTLA4 pero en direcciones opuestas (Tabla 2). Como consecuencia de ello, los cocientes para cada uno de los tres isotipos, en particular para IgM e IgA son bastante diferentes en comparación con los de sujetos sanos, subrayando la especificidad de nuestros datos. La mayoría de estas diferencias fueron estadísticamente significativas (ver Tabla 2), en particular para el isotipo IgM en pacientes en tratamiento con anti-TNF y anti-IL6R / Ig-CTLA4, para el isotipo IgA en pacientes en tratamiento con anti-CD20 e IL6R / Ig-CTLA4 BT, y para el isotipo IgG para pacientes en tratamiento con agentes no biológicos y en tratamiento con IL6R / Ig-CTLA4. Conclusiones similares pueden extraerse a la hora de examinar los cocientes para los distintos isotipos (A / M, G / A, G / M) tanto para el título de inmunoglobulina total como para el de autoanticuerpos: existen diferencias estadísticamente significativas para alguno de estos cocientes entre pacientes y donantes sanos (Tabla 3) e importantes diferencias entre tratamientos (Fig. 6, comprobar el diferente comportamiento del cociente G/A para los títulos totales y de autoanticuerpos en pacientes con terapia anti-CD20).

Tabla 2. Niveles de los isotipos de Ig total y anti-CD26 en pacientes de AR en función de la terapia

	No BT (n=22)		Anti-TNF α BT (n=58)		Anti-CD20 BT (n=11)		Anti-IL6R/Ig-CTLA4 BT (n=15)	
	Media $\pm$ DS	CI (95%)	Media $\pm$ DS	CI (95%)	Media $\pm$ DS	CI (95%)	Media $\pm$ DS	CI (95%)
Anti-CD26 IgM (μ g/mL)	30.30 $\pm$ 20.49*	21.21-39.38	27.92 $\pm$ 18.08	23.16-32.67	16.85 $\pm$ 15.15*	6.67-27.03	32.94 $\pm$ 21.82	20.85-45.02
Anti-CD26 IgA (μ g/mL)	1.76 $\pm$ 0.92*	1.35-2.17	2.32 $\pm$ 1.51*	1.92-2.72	1.81 $\pm$ 1.44*	0.85-2.78	1.34 $\pm$ 0.71*	0.95-1.73
Anti-CD26 IgG (μ g/mL)	5.60 $\pm$ 3.13	4.21-6.98	6.08 $\pm$ 3.15	5.25-6.91	5.69 $\pm$ 3.68	3.21-8.16	5.62 $\pm$ 2.83	4.05-7.19
Total IgM (mg/mL)	3.26 $\pm$ 3.28*	1.80-4.71	5.22 $\pm$ 3.95*	4.18-6.26	2.23 $\pm$ 2.26*	0.71-3.74	4.02 $\pm$ 3.92	1.85-6.19
Total IgA (mg/mL)	5.56 $\pm$ 2.04	4.65-6.46	5.86 $\pm$ 1.82*	5.38-6.34	5.46 $\pm$ 1.11	4.71-6.21	4.81 $\pm$ 1.38*	4.05-5.58
Total IgG (mg/mL)	17.73 $\pm$ 12.68	12.11-23.35	24.23 $\pm$ 17.1*	19.74-28.73	15.73 $\pm$ 11.35*	8.10-23.35	22.85 $\pm$ 12.76	15.78-29.91
Cociente IgM (μ g/mg)	20.75 $\pm$ 25.75		10.42 $\pm$ 13.12*		26.36 $\pm$ 33.05*		30.79 $\pm$ 51.75*	
Cociente IgA (μ g/mg)	0.49 $\pm$ 0.67		0.47 $\pm$ 0.63*		0.32 $\pm$ 0.24*		0.29 $\pm$ 0.16*	
Cociente IgG (μ g/mg)	0.50 $\pm$ 0.78		0.96 $\pm$ 1.82*		0.79 $\pm$ 1.05		0.29 $\pm$ 0.17*	

Ig, inmunoglobulina, AR, artritis reumatoide, n= número de muestras; BT= terapia biológica; CI= intervalo de confianza; DS= desviación estándar.

* Valores significativamente diferentes entre los grupos (sin especificar) a p < 0.05 con el test t de Student

+ Valores significativamente diferentes a los del grupo sin terapia biológica (No BT) a p < 0.05 con el test t de Dunnett

Ig, inmunoglobulina, AR, artritis reumatoide, n= número de muestras; BT= terapia biológica; CI= intervalo de confianza; DS= desviación estándar.

* Valores significativamente diferentes entre los grupos (sin especificar) a $p < 0.05$ con el test t de Student

+ Valores significativamente diferentes a los del grupo sin terapia biológica (No BT) a $p < 0.05$ con el test t de Dunnett

Tabla 3. Niveles de los isotipos de Ig total y anti-CD26 en toda la cohorte de pacientes de AR (tratados con diferentes terapias)

	Controles (n=25)	Pacientes AR (n=106)
	Media $\pm$ SD	Media $\pm$ SD
Total Ig cociente A/M	1.3 $\pm$ 1.0	3.7 $\pm$ 6.7**
Total Ig cociente G/A	5.4 $\pm$ 1.3	4.8 $\pm$ 7.3
Total Ig cociente G/M	6.7 $\pm$ 5.2	11.3 $\pm$ 18.6*
Auto Ig cociente A/M	0.11 $\pm$ 0.04	0.13 $\pm$ 0.21
Auto Ig cociente G/A	1.7 $\pm$ 0.6	7.5 $\pm$ 27.1
Auto Ig cociente G/M	0.17 $\pm$ 0.06	0.32 $\pm$ 0.35**

Ig, inmunoglobulina, AR, artritis reumatoide, n= número de muestras; SD= desviación estándar.

* Valores significativamente diferentes entre los grupos (sin especificar) a $p < 0.05$ con el test t de Student

** Valores significativamente diferentes entre los grupos (sin especificar) a $p < 0.001$ con el test t de Student

Ejemplo 4.- Valor diagnóstico de los niveles de anticuerpos anti-CD26 / DPP-IV

Ya que nuestra cohorte de pacientes con AR mostró títulos elevados de autoanticuerpos anti-CD26, lo que señala su utilidad para seguir la capacidad de respuesta de los pacientes a la terapia a nivel individual, hemos valorado si alguno de los títulos de isotipos podría tener valor diagnóstico.

4.1 Niveles de anti-CD26 / DPP-IV en toda la cohorte

Los pacientes de la cohorte en estudio ya han sido diagnosticados y tratados. Por lo tanto, este grupo de sujetos no es ideal para la evaluación del valor de diagnóstico de los títulos de anticuerpos anti-CD26. Sin embargo, los títulos de isotipo IgG han demostrado que permanecen sin cambios con las terapias empleadas y por lo tanto pueden ser un buen indicador.

Además, para ensayar el rendimiento de los biomarcadores en una prueba de detección / diagnóstico, se han preparado curvas ROC representando los valores de sensibilidad obtenida frente a los valores de 1-especificidad para los autoanticuerpos anti-CD26 de los isotipos IgG, IgM e IgA, encontrando los siguientes valores de AUC, especificidad (E) y sensibilidad (S) en el cálculo del punto de corte óptimo:

- anti-CD26 IgM (Fig.7): AUC (IC 95%): 0,748 (0,666-0,830); punto de corte: 19 μ g / mL, 62% S, 88% E

- anti-CD26 IgG (Fig.8): AUC (IC 95%): 0,881 (0,825-0,938); punto de corte: 2,85 μ g / mL, 82% S, 96% E

- anti-CD26 IgA (Fig.9): AUC (IC 95%): 0,661 (,573-,749); punto de corte: 1,5 μ g / mL, 60% S, 80% E

- anti-CD26 IgG / IgG total (Figura 10): AUC (IC 95%): 0,741 (0,653 a 0,829); punto de corte: 0,24 μ g / mg, 60% S, 84% E

Estos puntos de corte son, respectivamente, 1,41, 1,33, 1,17 y 1,26 veces los valores de referencia (media de las concentraciones de biomarcadores donantes sanos).

4.2 Niveles de autoanticuerpos anti-CD26 / DPP-IV en pacientes sometidos a FARME pero sin ninguna terapia biológica

A continuación, evaluamos el grupo sometido a FARMES pero sin ninguna terapia biológica (noBT), que se parecería mejor a los pacientes no diagnosticados y / o pacientes cercanos a

una pre-AR en el sentido de que estas terapias no cambian la expresión de CD26 por lo menos en las poblaciones de leucocitos (Ellingsen T y cols, Scand J Immunol 2007; 66: 451-7). Se encuentra una sensibilidad del 77% (17/22) para el isotipo anti-CD26 IgG (con un punto de corte de 2,85 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Un resultado similar del 73% (16/22) de sensibilidad se encontró para el anti-CD26 IgM (con un valor de corte de 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$) e IgA 64% (con un valor de corte de 1,7 $\mu\text{g} / \text{mL}$) (Figura 1). A destacar, sólo 3 de 22 pacientes fueron negativos para ambos isotipos IgG e IgM y 2/22 para los tres.

Además, para ensayar el rendimiento de los biomarcadores en una prueba de detección / diagnóstico, se han preparado curvas ROC representando los valores de sensibilidad obtenida frente a los valores 1-especificidad para los autoanticuerpos anti-CD26 de los isotipos IgG, IgM e IgA, encontrando los siguientes valores de AUC, especificidad (e) y sensibilidad (S) en el cálculo del punto de corte óptimo:

- anti-CD26 IgM (Fig.11): AUC (IC 95%): 0,751 (0,583 a 0,919); punto de corte de 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 73% S, 92% E

- anti-CD26 IgG (Fig.12): AUC (IC 95%): 0,846 (0,718-0,975); punto de corte de 2,85 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 77% S, 96% E

- anti-CD26 IgA (Fig.13): AUC (IC 95%): 0,672 (0,495-0,848); punto de corte de 1,7 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 64% S, el 80% E

- anti-CD26 IgG / IgG total (Fig.14): AUC (IC 95%): 0,804 (0,670 -0,938); punto de corte: 0,24 $\mu\text{g} / \text{mg}$ (igual que en la cohorte completa), 68% S, 84% E; y con punto de corte de: 0,25 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 68% S, 88% E

Estos puntos de corte son, respectivamente, 1,48, 1,33, 1,33 y 1,26 veces que los valores de referencia (media de las concentraciones de biomarcadores donantes sanos).

Se observa que una diferencia importante entre los resultados de los inventores y los publicados previamente por Cuchacovich y cols (Cuchacovich M et al, Clin Exp Rheumatol 2001;19: 673-80) es que en el estudio previo se encontraron títulos más elevados de autoanticuerpos anti-CD26 en AR y otras enfermedades autoinmunes, en particular, del isotipo IgA. Sin embargo, los inventores han encontrado niveles elevados de las tres clases evaluadas pero en particular para los isotipos IgM e IgG, que de hecho mostraron mejores valores de diagnóstico en comparación con el isotipo IgA. Debe señalarse que Cuchacovich et al. sólo muestran los cocientes entre el nivel de autoanticuerpos / Ig total para cada isotipo mientras que en el Ejemplo 3 anterior se presentan los resultados para cada una de estas

determinaciones individuales y para su cociente, y de hecho muestran que los niveles de anticuerpos anti-CD26 de cada isotipo eran independientes de los cambios en los niveles totales de Ig para cada isotipo. Las diferencias entre los títulos de autoanticuerpos anti-CD26 entre ambos estudios también pueden estar relacionadas en parte al hecho de que hemos
 5 utilizado como antígeno para el ELISA una proteína sCD26 recombinante en lugar de antígeno sCD26 aislado a partir de sueros de pacientes, el cual ha sido descrito como una molécula más compleja (Cuchacovich M y cols, Clin Exp Rheumatol 2001; 19: 673-80, o Lambeir AM y cols, Crit Rev Clin Lab Sci 2003; 40: 209-94, o Cordero OJ et al, Cancer Immunol Immunother 2009; 58: 1723-47).

Ejemplo 5.- Valor diagnóstico de los niveles totales de anticuerpos IgA

Curiosamente, durante la elaboración de las curvas ROC para los autoanticuerpos anti-CD26, anticuerpos totales y los cocientes de los mismos para los isotipos IgA, IgM e IgG, los inventores han observado que los anticuerpos totales del isotipo IgA han demostrado ser un
 15 muy buen discriminador entre donantes sanos (HD) y la población de pacientes RA, tanto para la cohorte completa (véase la figura 15, AUC (IC 95%) de 0,979 (0,953-1,000); punto de corte: 0,24 µg / mL, 60% S, 84% e) y el grupo de pacientes con terapia no biológica, que es asimilable a pacientes sin diagnosticar o pre-RA (véase la Figura 16, el AUC (IC 95%) de 0,947 (0,859 -1,000), punto de corte: 2,5 mg / mL, 96% S, el 76% e, y punto de corte: 3 mg /
 20 mL, 91% S, 100% E).

Ejemplo 6.- Las correlaciones de anti-CD26 / DPP-IV niveles de anticuerpos con parámetros de actividad de la enfermedad de los pacientes con AR

Los inventores han mostrado anteriormente correlaciones entre la puntuación DAS28, componentes del DAS28 (clínicos: TJC, SJC, PGA), y las variables de laboratorio: ESR y
 25 CRP, u otros marcadores de actividad de la AR (HAQ, hemoglobina, plaquetas y hematocrito) con subconjuntos de células T definidas por la expresión en la superficie celular de CD26 (Cordero OJ y cols, PLoS One 2015, 10 ; e0131992).

6.1 Niveles de autoanticuerpos anti-CD26 / DPP-IV en la cohorte completa.

En este caso, las correlaciones de actividad de la enfermedad se analizaron primero frente a los niveles totales de cada isotipo, incluyendo el factor reumatoide (RF) y ACPA, en la cohorte completa. Los títulos totales de las tres clases de Ig no correlacionan con el DAS28, sin
 35 embargo se encuentran algunas correlaciones estadísticamente significativas entre los títulos totales para los tres isotipos y ESR ($r = 0,272$, $p = 0,005$ para IgM; $r = 0,213$, $p = 0,028$ para

IgG; $r = 0,280$, $p = 0,004$ para IgA). Por otra parte, el isotipo IgG correlaciona negativamente con TJC y la IgM total con el HAQ.

Los niveles de anti-CD26 tampoco correlacionan con la puntuación DAS28 en la cohorte completa. Sin embargo, los títulos de autoanticuerpos anti-CD26 de los tres isotipos correlacionan negativamente con TJC ($r = -0,272$, $p = 0,036$ para IgM; $r = -0,210$, $p = 0,032$ para IgG; $r = -0,273$, $p = 0,005$ para IgA) ; además, los niveles de autoanticuerpos anti-CD26 IgG correlacionan negativamente con el hematocrito y los niveles de autoanticuerpos anti-CD26 IgA con ESR ($r = -0,360$, $p < 0,001$). Finalmente, los cocientes para los isotipos IgG e IgA correlacionan con la CRP.

6.2 Niveles de anticuerpos anti-CD26 / DPP-IV en función de la terapia.

Para comprobar el efecto que cualquiera de las diferentes terapias pueden tener sobre las correlaciones entre los niveles de anticuerpos y las puntuaciones clínicas, se realizó el mismo análisis (junto con controles internos) para cada grupo de pacientes sometidos a diferentes tratamientos. En el grupo sin BT, mientras que se observan fuertes correlaciones entre todos los títulos totales de Ig (y que muestran correlaciones con el recuento de plaquetas), sólo los títulos de autoanticuerpos anti-CD26 de los isotipos IgA e IgM muestran una correlación entre ellos y sólo el cociente para el isotipo IgA muestran una correlación muy fuerte con la TJC ($r = 0,704$, $p < 0,001$).

En el grupo de anti-TNF, los títulos totales de IgA no correlacionan con los niveles de los otros dos isotipos, mostrando sólo una correlación positiva con la ESR, positivamente (datos no mostrados). Los títulos totales de IgM también correlacionan positivamente con la Hb y el hematocrito y negativamente con la CRP, mientras que los títulos de IgG correlacionan negativamente con el ESR y el recuento de plaquetas (datos no mostrados). Curiosamente, los títulos de autoanticuerpos anti-CD26 IgA correlacionan fuertemente con el TJC y el DAS28 (Figura 2A y 2B) y los niveles de autoanticuerpos anti-CD26 IgM correlacionan positivamente con el TJC ($r = 0,295$, $p = 0,024$). No se han encontrado correlaciones para el isotipo IgG.

Sin embargo, en el grupo de anti-CD20, estos títulos de autoanticuerpos anti-CD26 IgG correlacionan muy fuertemente con el TJC, SJC, DAS28 y PGA (Figura 3 A-D). No se encontraron correlaciones para los otros dos isotipos, aunque los títulos de autoanticuerpos anti-CD26 IgG e IgA están correlacionados entre ellos. En este grupo, los títulos totales de cada isotipo no correlacionan entre ellos y las únicas correlaciones detectadas fueron entre

el cociente del isotipo IgM tanto con HAQ como con PGA y el cociente entre el isotipo IgG con plaquetas (datos no mostrados).

Por último, en el grupo de anti-IL6R / Ig-CTLA4, mientras que los niveles totales de IgA no correlacionan con los títulos de los otros isotipos (como en el grupo de anti-TNF) y los títulos de autoanticuerpos anti-CD26 IgA e IgM no correlacionan entre ellos (al contrario de lo que ocurre en el grupo noBT), los títulos de autoanticuerpos para las otras combinaciones (IgA con IgG e IgM con IgG) sí lo están. En este grupo, sólo el cociente para el isotipo IgG correlaciona con TJC y la IgG total con el hematocrito.

En conjunto, los datos actuales sugieren: a) una relación específica entre los autoanticuerpos anti-CD26 con la actividad en articulaciones y la enfermedad, b) los niveles de estos autoanticuerpos son modificados de forma distinta por cada terapia, y c) que proporcionan una información diferente en comparación con la mayoría de los parámetros de actividad de la enfermedad utilizados frecuentemente en la actualidad (VSG, PCR, recuento de plaquetas, los niveles de Hb o hematocrito).

Ejemplo 7.- Detección de títulos de autoanticuerpos anti-CD26 más elevados en fumadores.

El tabaco es un factor ambiental desencadenante de autoinmunidad en la pacientes con AR positivos para ACPA (Reynisdóttir G y cols, Arthritis Rheum 2014; 66:31-9, doi:10.1002 / art.38201, o Catrina AI y cols, Nat Rev Rheumatol 2014; 10: 645-53, doi:10.1038 / nrrheum.2014.115, o Vossenaar ER y cols, Arthritis Res Ther 2004; 6: 107-111). Decidimos comparar los títulos medios de autoanticuerpos anti-CD26 para los tres isotipos dividiendo la cohorte completa de pacientes AR en tres grupos en función de su consumo de tabaco, fumadores actuales (n = 18), ex-fumadores (n = 28) o no fumadores (n = 59) . Mientras que los títulos de IgA fueron similares entre los tres grupos, los isotipos IgM e IgG mostraron niveles más altos en los ex-fumadores en particular (26,0 mg / mL en los no fumadores en comparación con los 31,8 mg / ml en los ex-fumadores para IgM, y 5,5 mg / mL a 6,7 mg / mL para IgG), aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística.

A continuación, analizamos la cohorte completa de pacientes RA teniendo en cuenta la terapia (Tabla 4). Curiosamente, en el grupo de no-BT, los títulos de autoanticuerpos anti-CD26 IgM son significativamente mayores en los pacientes ex-fumadores en comparación con los no fumadores. Aunque hay pocos pacientes fumadores actuales en este grupo, también mostraron títulos de autoanticuerpos superiores. Los autoanticuerpos anti-CD26 IgG también mostraron una tendencia a un mayor título en ex-fumadores en comparación con los

5 otros grupos, aunque esta tendencia no alcanzó significación estadística. Señalar que mientras que los niveles de autoanticuerpos anti-CD26 IgG o IgA no cambian entre las diferentes terapias, los niveles de autoanticuerpos anti-CD26 IgM fueron atenuados en los ex-fumadores en el grupo de anti-TNF y en todos los pacientes en el grupo de tratamiento con anti-CD20; sin embargo, en el grupo tratado con anti-IL6R / Ig-CTLA4 los no fumadores mostraron niveles elevados de autoanticuerpos anti-CD26 del isotipo IgM (Tabla 4).

Tabla 4. Niveles de los isotipos de Ig anti-CD26 en pacientes de AR con diferentes terapias de acuerdo a su estatus de fumador

		No BT (n=22)	Anti-TNF α BT (n=58)	Anti-CD20 BT (n=11)	Anti-IL6R/Ig-CTLA4 BT (n=15)
		Media $\pm$ SD (n)	Media $\pm$ SD (n)	Media $\pm$ SD (n)	Media $\pm$ SD (n)
Anti-CD26 IgM (μg/mL)	No fumadores	22.4 $\pm$ 18.0 (12)	25.4 $\pm$ 19.0 (33)	13.5 $\pm$ 7.7 (3)	37.1 $\pm$ 25.5 (10)
	Fumadores	28.6 $\pm$ 3.8 (2)	33.0 $\pm$ 16.5 (13)	9.7 $\pm$ 9.1 (4)	-
	Antiguos fumadores	42.6 $\pm$ 21.7* (8)	29.6 $\pm$ 18.0 (11)	25.6 $\pm$ 22.0 (4)	24.6 $\pm$ 8.3 (5)
Anti-CD26 IgG (μg/mL)	No fumadores	4.6 $\pm$ 3.2	5.9 $\pm$ 3.4	4.8 $\pm$ 4.0	5.7 $\pm$ 3.1
	Fumadores	8.1 $\pm$ 1.6	6.0 $\pm$ 2.9	4.0 $\pm$ 2.0	-
	Antiguos fumadores	6.4 $\pm$ 2.9	6.9 $\pm$ 2.7	7.9 $\pm$ 4.0	5.6 $\pm$ 2.7
Anti-CD26 IgA (μg/mL)	No fumadores	1.6 $\pm$ 0.8	2.4 $\pm$ 1.6	1.4 $\pm$ 2.1	1.3 $\pm$ 0.8
	Fumadores	1.7 $\pm$ 1.4	2.1 $\pm$ 1.3	2.1 $\pm$ 0.8	-
	Antiguos fumadores	2.0 $\pm$ 1.0	2.4 $\pm$ 1.6	2.1 $\pm$ 1.2	1.5 $\pm$ 0.7

Ig, inmunoglobulina, AR, artritis reumatoide, n= número de muestras; BT= terapia biológica; CI= intervalo de confianza; DS= desviación estándar.

* Valores significativamente diferentes $p < 0.05$ con el test t de Student entre los grupos clasificados de acuerdo a su estatus de fumador (antiguos fumadores vs no fumadores). Los grupos se compararon sólo dentro de cada terapia.

Ejemplo 8.- Prueba ACPA

Los resultados obtenidos, combinando la bien establecida herramienta Elia[™] CCP de segunda generación en la práctica clínica junto con nuestro ELISA casero para auto-anticuerpos anti-CD26 (sólo fue probado el isotipo IgG) nos llevan a la conclusión de que los anticuerpos anti-auto CD26 no son ACPA. Cuando los sobrenadantes de suero tanto de donantes sanos como de pacientes con AR fueron recuperados de la prueba de ACPA y se ensayaron para la presencia de autoanticuerpos anti-CD26, se detectaba una absorbancia similar a la obtenida con la misma muestra de suero probado sólo utilizando nuestra prueba ELISA anti-CD26 (no se muestra) (Figura 4A, pacientes con AR mostrando datos más altos de absorbancia). La prueba ACPA mostró los resultados esperados, con los niveles más altos en el suero de los tres pacientes analizados en comparación con tres muestras de control de donantes sanos, a excepción de uno de ellos, que también fue positiva (un candidato para el desarrollo de la artritis) (Figura 4B, gris oscuro).

Para verificar estos resultados, también se realizó el análisis inverso, donde sobrenadantes recuperados del ELISA anti-CD26 fueron posteriormente usados en los test de ACPA. Aunque las absorbancias fueron similares a las obtenidas después de la incubación directa del mismo suero en el ensayo de ACPA, hubo diferencias menores en cuatro de las muestras y más significativas en dos de ellas, un control sano y un paciente con AR (Figura 4B, en gris claro). En este caso, cuando las proteínas capturadas en el ensayo se eluyeron de la placa (ver Métodos), se observó una señal positiva menor (datos no mostrados), que apunta a la posibilidad de que una parte menor de autoanticuerpos ACPA también puedan unirse a CD26.

Ejemplo 9.- Auto-anticuerpos anti-CD26 séricos y sus correlaciones con la actividad de DPP-IV y las concentraciones de sCD26 en la cohorte de pacientes con AR tratados con diferentes terapias

9.1 Auto-anticuerpos anti-CD26 en suero y sus correlaciones con la actividad de la DPP-IV y las concentraciones de sCD26 en toda la cohorte

Determinados para el grupo control sano (véase el ejemplo 2 anterior), analizamos las correlaciones de los isotipos de Ig y sus relaciones con la actividad de la DPP-IV en suero y las concentraciones de sCD26 en toda la cohorte de pacientes. Encontramos correlaciones positivas cercanas a la significación estadística entre IgG total e IgG anti-CD26 con la concentración de sCD26 pero no con la actividad enzimática para el total de la cohorte.

9.2. Auto-anticuerpos séricos anti-CD26 y sus correlaciones con la actividad de DPP-IV y las concentraciones de sCD26 en relación con la terapia empleada.

Cuando se realizó el mismo análisis para cada uno de los grupos de pacientes de acuerdo a la terapia recibida, se encontraron muchas correlaciones interesantes. En el grupo sin TB (noTB), los niveles totales de IgA e IgM se correlacionan positivamente con la actividad de la DPP-IV, pero no con la concentración de sCD26 (Figura 5A), mientras que en el grupo de anti-IL6R / Ig-CTLA4, el total de los títulos de IgM e IgG tienen una correlación negativa con la actividad DPP-IV (Figura 5D). En el grupo de anti-TNF α que presentan aumento de los niveles de actividad DPP-IV (Cuchacovich M y cols, Clin Exp Rheumatol 2001;19: 673-80), además de los títulos totales de IgA e IgM, los títulos de IgG anti-CD26 también se correlacionaron positivamente con la actividad DPP-IV (Figura 5B). Sólo en este grupo (Figura 5B), títulos totales de IgM e IgG y los títulos de IgG e IgM anti-CD26 se correlacionan positivamente con la concentración de sCD26, mientras que en el grupo antiCD20, que muestra disminución de los niveles de autoanticuerpos IgM, tanto los títulos de IgM anti-CD26 como la ratio, muestran una fuerte correlación negativa con la concentración de sCD26 (Figura 5C).

Estos resultados apuntan a la idea de que: a) los niveles de auto-Anticuerpos no se relacionan con la reducción de las concentraciones de sus antígenos (sCD26) en los pacientes con AR, ya que la única correlación vista se observó en el grupo anti-TNF, con una correlación positiva; b) la actividad DPP-IV y la concentración de sCD26, reducida en pacientes con AR y afectadas por terapias (Cordero OJ y cols., PLoS ONE 2015; 10: e0131992), están relacionados con la misma vía que aumenta los títulos de autoanticuerpos anti-CD26; c) junto con el hecho de que se encontraron en cada grupo de pacientes diferentes niveles de correlación entre la actividad de DPP-IV y la concentración de sCD26 (que no se correlacionan en el grupo no-TB y en el grupo de tratamiento con anti-IL6R / Ig-CTLA4 y se correlacionan más fuertemente en el grupo de anti-CD20, datos no mostrados), concluimos también que la actividad de DPP-IV y la concentración de sCD26 están implicadas en la patogénesis de la AR de diferentes formas; y d) por último, diferentes terapias tienen un profundo impacto en estas vías, incluso de maneras opuestas.

Curiosamente, Cuchacovich y cols, mostraron una correlación negativa entre los niveles circulantes de DPP-IV y los títulos de autoanticuerpos IgA anti-CD26 en la AR (Cuchacovich M y cols, Clin Exp Rheumatol 2001;19:673-80, Cuchacovich M y cols, Clin Immunol Diagn Lab 2002; 9:1253-9), una correlación que no se encontró en el presente estudio. Al contrario, cuando se encontraron correlaciones, estas eran positivas y sobre todo para los isotipos IgG e IgM de anti-CD26. Nosotros encontramos una correlación negativa en el grupo de pacientes

tratados con anti-CD20, pero en este grupo, la terapia no parecía disminuir los niveles de autoanticuerpos en general. Se puede concluir, por lo tanto, que el deterioro de la actividad de la DPP-IV y la concentración de sCD26 en los pacientes con AR se relaciona con la misma vía que aumenta los títulos de autoanticuerpos anti-CD26 que, por tanto, no parece estar
5 implicada en la eliminación en el suero del sCD26.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para el cribado de un sujeto que tiene una enfermedad reumática
5 inflamatoria que comprende los siguientes pasos:
a) la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgG en una muestra aislada de dicho sujeto que contiene anticuerpos;
b) comparar los niveles en dicha muestra que contiene anticuerpos con un valor de referencia, en donde un aumento de los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgG en la muestra
10 del sujeto con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de enfermedad y en el que dicho valor de referencia corresponde a los niveles medios de anticuerpos anti-CD26 IgG en sujetos sanos.
2. Método *in vitro* para la obtención de datos útiles para el diagnóstico de una enfermedad
15 reumática inflamatoria en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas a) y b) de la reivindicación 1,
en donde un aumento de los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgG en la muestra del sujeto con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de la enfermedad y
en el que dicho valor de referencia corresponde a los niveles medios de anticuerpos anti-
20 CD26 IgG en sujetos sanos.
3. Método *in vitro* para el diagnóstico de una enfermedad reumática inflamatoria en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas a) y b) de la reivindicación 1, en donde un aumento de los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgG en la muestra del sujeto con respecto
25 a dicho valor de referencia es indicativo de enfermedad y
en el que dicho valor de referencia corresponde a los niveles medios de anticuerpos anti-CD26 IgG en sujetos sanos.
4. Método *in vitro* para clasificar a sujetos como i) sujetos sanos o como ii) sujetos que
30 tienen una enfermedad reumática inflamatoria, comprendiendo dicho método las etapas a) y b) de la reivindicación 1,
donde un aumento de los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgG en la muestra del sujeto con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de enfermedad y
en el que dicho valor de referencia corresponde a los niveles medios de anticuerpos anti-
35 CD26 IgG en sujetos sanos.

5. Método *in vitro* de monitorización de la enfermedad y/o monitorización de la respuesta a un tratamiento en un sujeto que tiene una enfermedad reumática inflamatoria, comprendiendo dicho método las etapas a) y b) de la reivindicación 1, donde un aumento de los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgG en la muestra del sujeto con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de enfermedad y en el que dicho valor de referencia corresponde a los niveles medios de anticuerpos anti-CD26 IgG en sujetos sanos.
6. Método *in vitro* para la clasificación de un sujeto como respondedor a un tratamiento para una enfermedad reumática inflamatoria, dicho método comprende las etapas a) y b) de la reivindicación 1, donde un aumento de los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgG en la muestra del sujeto con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de la falta de respuesta y en el que dicho valor de referencia corresponde a los niveles medios de anticuerpos anti-CD26 IgG en sujetos sanos.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la enfermedad reumática inflamatoria se selecciona de entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide juvenil, artritis psoriásica y la espondiloartropatía.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha enfermedad reumática inflamatoria es artritis reumatoide.
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, método que comprende las etapas a) y b) de la reivindicación 1 y que comprende además:
 - a) la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 de isotipo IgM y/o IgA en dicha muestra que contiene anticuerpos;
 - b) comparar los niveles de anticuerpos anti-CD26 de isotipo IgM y/o IgA en dicha muestra que contiene anticuerpos con un valor de referencia;en donde un aumento del valor de los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgG y de los niveles de los isotipos IgM y/o IgA en la muestra del sujeto respecto al valor de referencia correspondiente es indicativo de enfermedad; en el que el valor de referencia corresponde a los niveles medios en sujetos sanos.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que los niveles de anticuerpos anti-CD26 determinados se seleccionan del grupo que consiste en:

- i. los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgG y los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgM;
- ii. los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgG y los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgA y
- iii. los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgG, los niveles de anticuerpos anti-CD26 IgM y niveles de anticuerpos anti-CD26 IgA.

5

11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el aumento de dichos niveles de anticuerpos anti-CD26 con respecto a dicho valor de referencia es de al menos 1,3 veces, preferiblemente de al menos 1,4 veces y, más preferiblemente, de al menos 1,5 veces .

10

12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho sujeto es un sujeto humano.

15

13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicha muestra que contiene anticuerpo es sangre entera, suero o plasma, preferentemente suero.

14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que los niveles de anticuerpos se determinan utilizando un ensayo ELISA, un ensayo de células-ELISA o cualquier versión multiplex de los mismos.

20

15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dichos anticuerpos anti-CD26 son anticuerpos específicos contra CD26 soluble recombinante.

25

16. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que dicho sujeto no ha recibido previamente o no está recibiendo un tratamiento para dicha enfermedad reumática inflamatoria.

30

17. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que dicho sujeto ha recibido previamente o está recibiendo tratamiento para dicha enfermedad reumática inflamatoria, preferiblemente, en el que dicho tratamiento se selecciona del siguiente grupo de fármacos:

- a. Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAME);
- b. agentes anti-TNF alfa;
- c. agentes anti-CD20 y
- d. agentes anti-IL6R y/o proteínas de fusión Fc-CTLA4.

35

18. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que dicho método comprende además la determinación de otros biomarcadores asociados a dicha enfermedad reumática inflamatoria, preferiblemente, los biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpos anti-péptidos citrulinados (ACPA), anticuerpos factor reumatoide, anticuerpos anti lectina ligada a manosa (MBL), velocidad de sedimentación globular (VSG), proteína C-reactiva (PCR), recuento de plaquetas, niveles de hemoglobina y hematocrito.
19. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que dicho método comprende además la determinación de parámetros clínicos, donde dichos parámetros clínicos se seleccionan del grupo que consiste en rigidez matutina, artritis en tres o más articulaciones, afectación de la articulación de la mano, artritis simétrica, nódulos reumatoides, y cambios radiográficos.
20. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que dicho método comprende además el almacenamiento de los resultados del método en un soporte de datos, preferiblemente en el que dicho soporte de datos es un medio legible por ordenador.
21. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, caracterizado por implementarse en un ordenador.
22. Uso de un fármaco seleccionado de la siguiente lista:
- a. Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAME);
 - b. Agentes anti-TNF alfa;
 - c. Agentes anti-CD20; y
 - d. Agentes anti-IL6R y/o proteínas de fusión Fc-CTLA4;
- para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad reumática inflamatoria, donde dicho sujeto ha sido seleccionado usando un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21.
23. Kit que comprende reactivos para la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 en una muestra aislada de un sujeto que contiene anticuerpos, en el que dicho kit comprende a. los siguientes reactivos para la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 de los isotipos IgG e IgM:

- i. CD26 soluble (sCD26) purificado o sintetizado, un fragmento antigénico del mismo o una célula que expresa CD26 o un fragmento antigénico del mismo;
 - ii. un anticuerpo anti-IgG marcado; y
 - iii. un anticuerpo anti-IgM marcado; y
- 5 b. opcionalmente, instrucciones para el uso de dichos reactivos en la determinación de los niveles de los isotipos IgG e IgM de los anticuerpos anti-CD26 en una muestra que contiene anticuerpos aislada de dicho sujeto.
24. El kit según la reivindicación 23, en el que dicho kit comprende además:
- 10 a. un reactivo para la determinación de los niveles de anticuerpo anti-CD26 del isotipo IgA, donde dicho reactivo consiste en un anticuerpo anti-IgA marcado; y
- b. opcionalmente, instrucciones para el uso de dicho reactivo en la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 del isotipo IgA en dicha muestra que contiene anticuerpos.
- 15 25. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 23 o 24, en el que dicho kit comprende además:
- a. un reactivo para determinar los niveles de anticuerpos totales de los isotipos IgM, IgG y/o IgA, donde dicho reactivo consiste en:
- i. un anticuerpo anti-IgM, anti-IgG y/o anti-IgA; y
- 20 ii. un anticuerpo anti-IgM, anti-IgG y/o anti-IgA marcado; y
- b. opcionalmente, instrucciones para el uso de dicho reactivo en la determinación de los niveles de anticuerpos totales de isotipo IgM, IgG y/o IgA en dicha muestra que contiene anticuerpos.
- 25 26. Uso de un kit para el cribado, diagnóstico y/o monitorización de una enfermedad reumática inflamatoria y/o para la monitorización de la respuesta a un tratamiento en una muestra que contiene anticuerpos aislada de un sujeto, en el que dicho kit comprende:
- a. los siguientes reactivos para la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 del isotipo IgG:
- 30 i. CD26 soluble (sCD26) purificado o sintetizado, un fragmento antigénico del mismo o una célula que expresa CD26 o un fragmento antigénico del mismo; y
- ii. un anticuerpo anti-IgG marcado; y
- b. opcionalmente, instrucciones para el uso de dicho reactivo en la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 de isotipo IgG en una muestra que contiene anticuerpos
- 35 aislada de dicho sujeto.
27. El uso de un kit según la reivindicación 26, en el que dicho kit comprende además:

- a. un anticuerpo anti-IgM marcado; y
- b. opcionalmente, instrucciones para el uso de dicho reactivo en la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 de isotipo IgM en dicha muestra que contiene anticuerpos.

5 28. El uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 26 o 27, donde dicho kit comprende además:

- a. un anticuerpo anti-IgA marcado; y
- b. opcionalmente, instrucciones para el uso de dicho reactivo en la determinación de los niveles de anticuerpos anti-CD26 de isotipo IgA en dicha muestra que contiene anticuerpos.

10

29. El uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, en el que dicho kit comprende además:

a. un reactivo para determinar los niveles de anticuerpos totales de isotipo IgM, IgG y/o IgA, donde dicho reactivo consiste en:

15

- i. un anticuerpo anti-IgM, anti-IgG y/o anti-IgA; y
- ii. un anticuerpo anti-IgM, anti-IgG y/o anti-IgA marcado; y

b. opcionalmente, instrucciones para el uso de dicho reactivo en la determinación de los niveles de anticuerpos totales de isotipo IgM, IgG y/o IgA en dicha muestra que contiene anticuerpos.

20

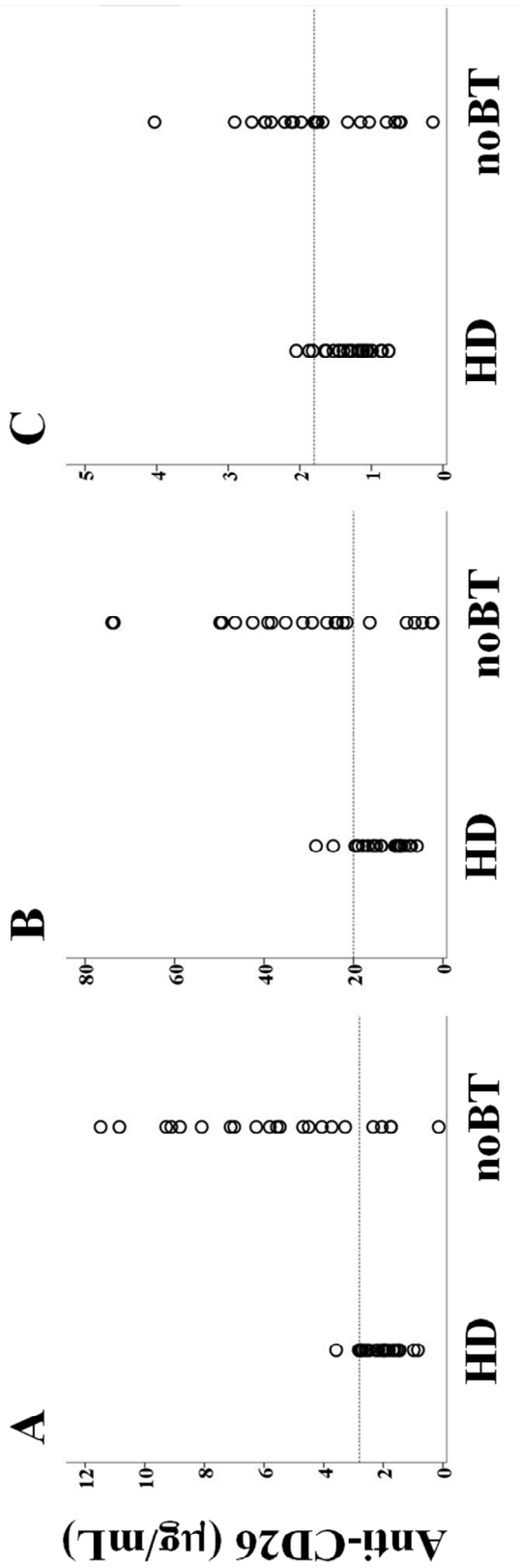


Fig. 1

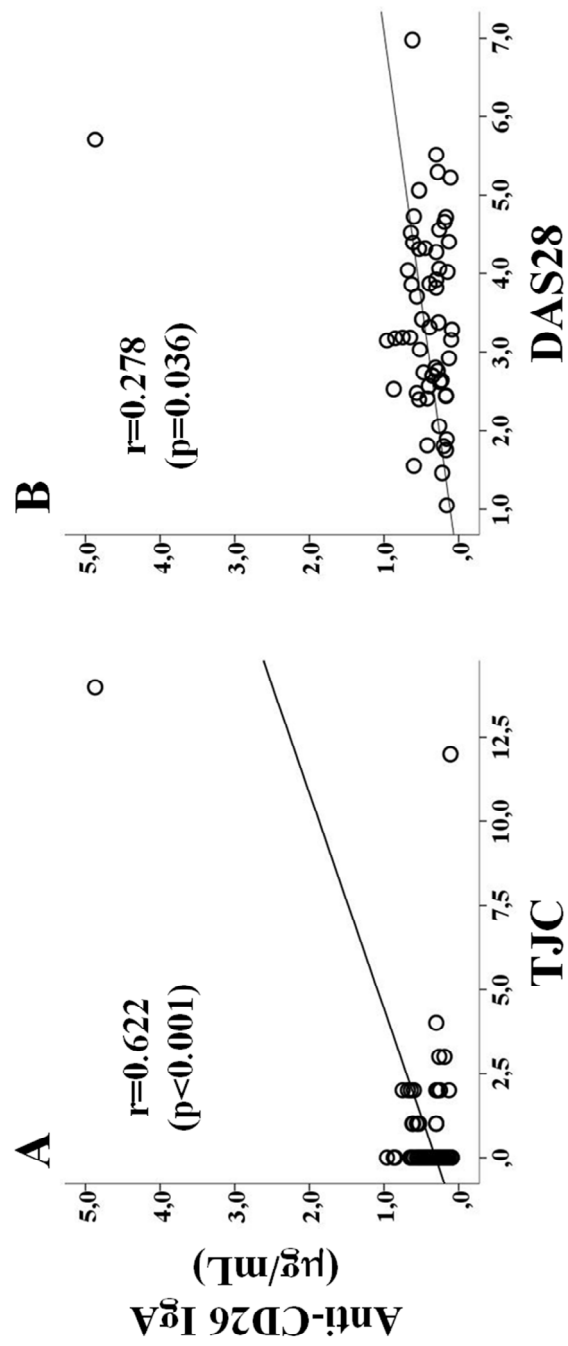


Fig. 2

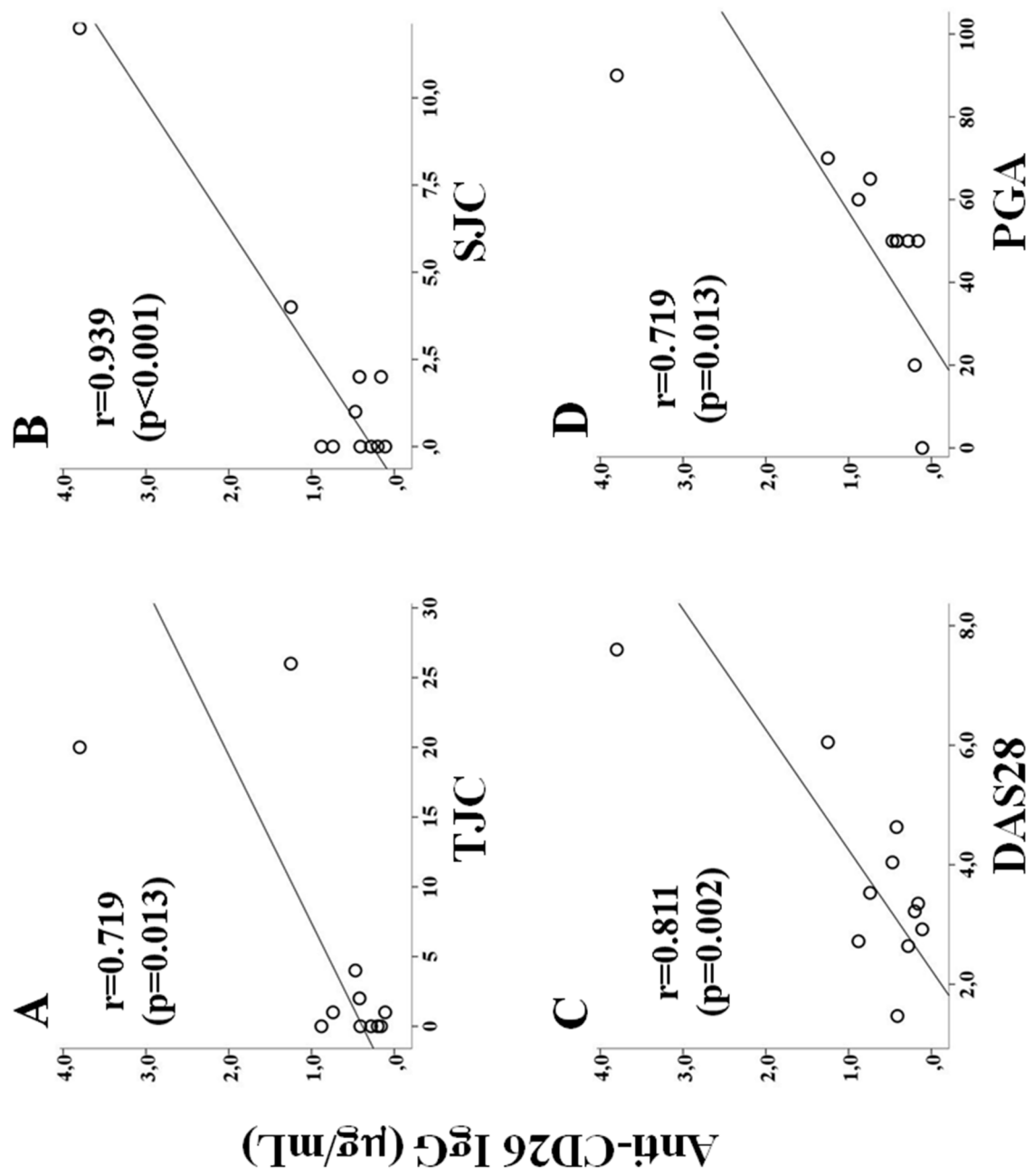


Fig. 3

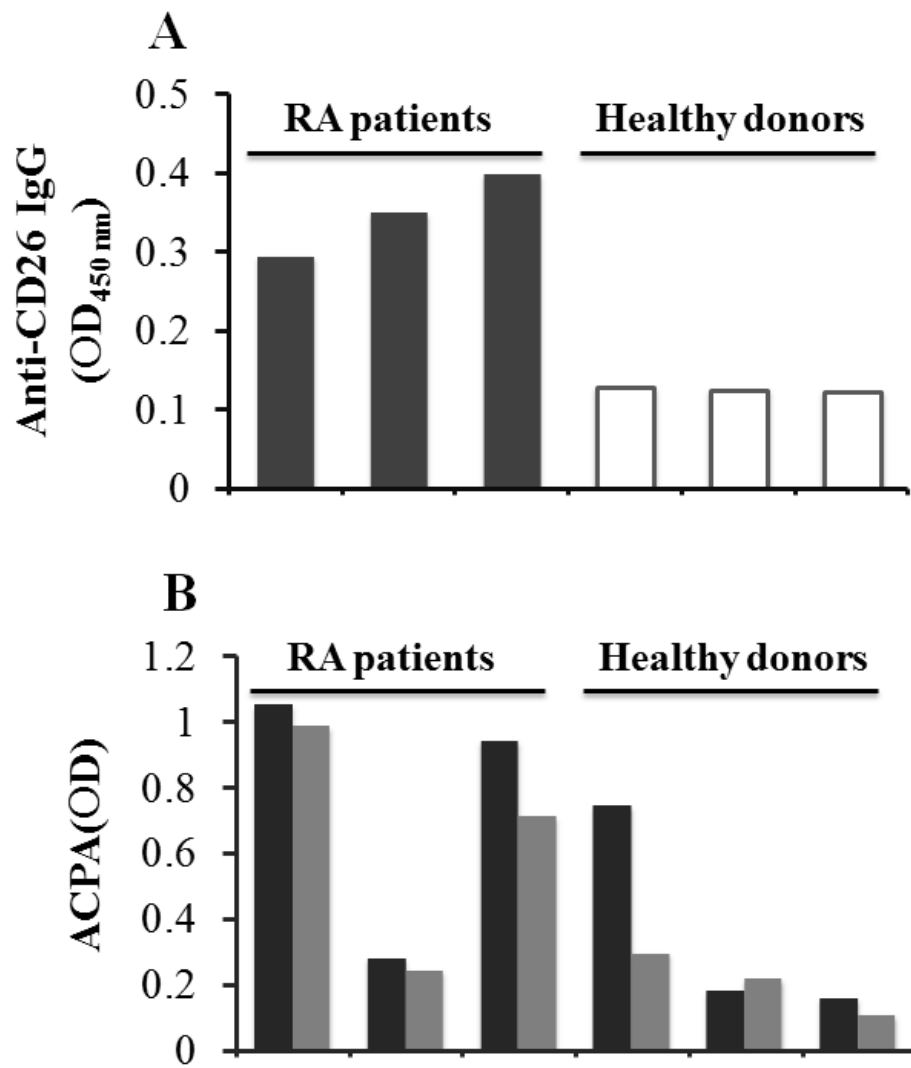


Fig. 4

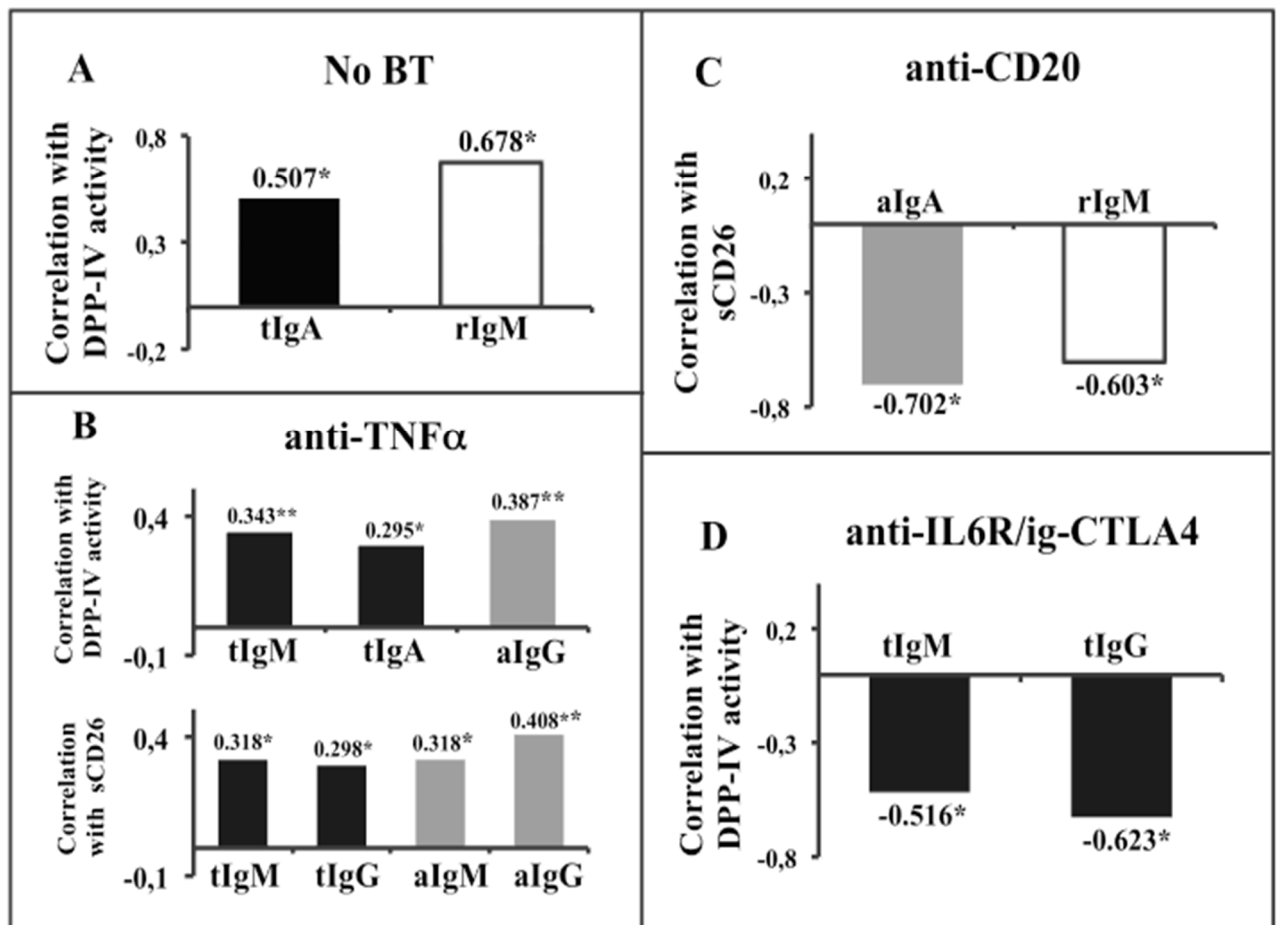


Fig. 5

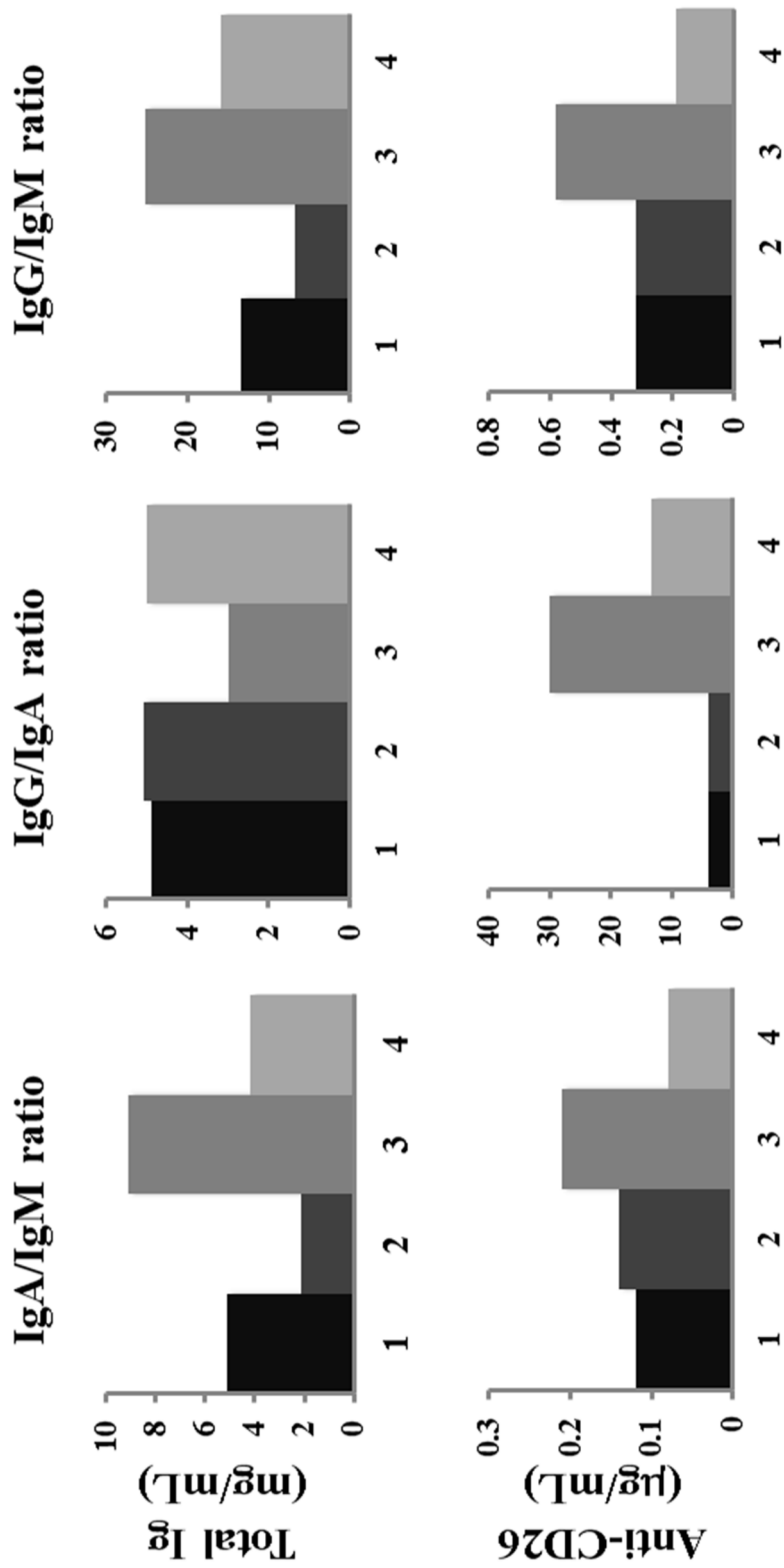


Fig. 6

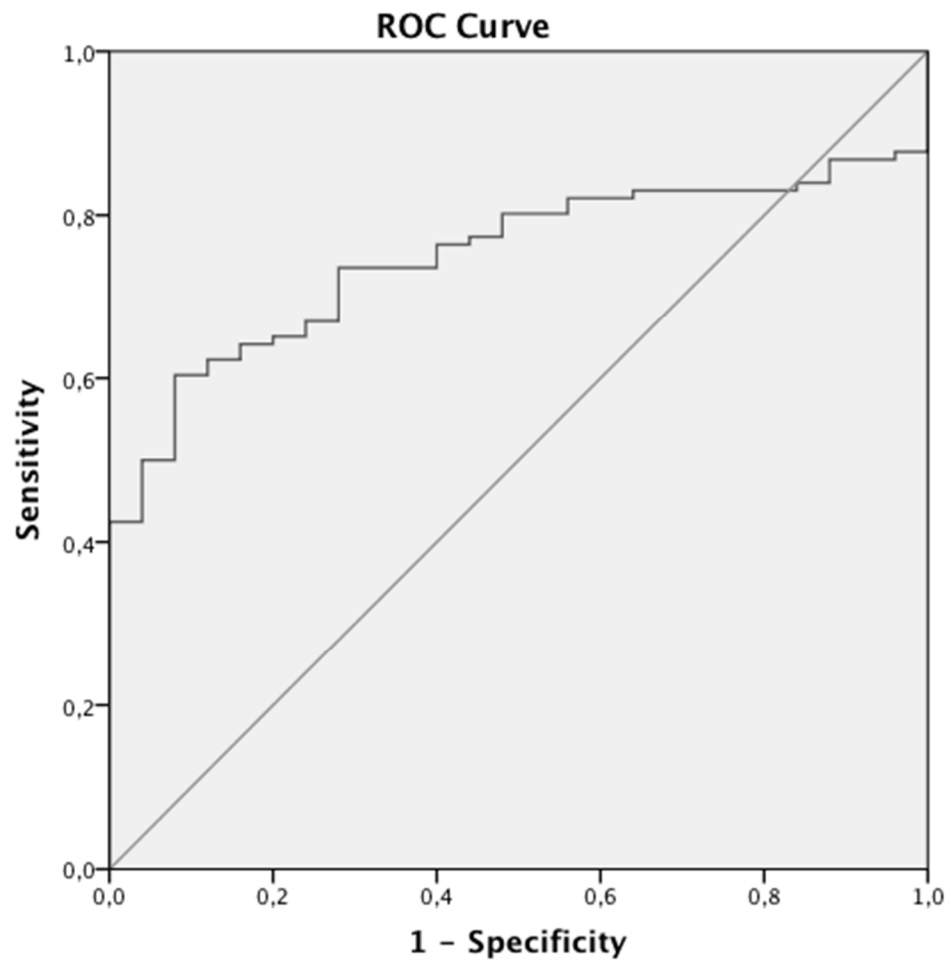


Fig. 7

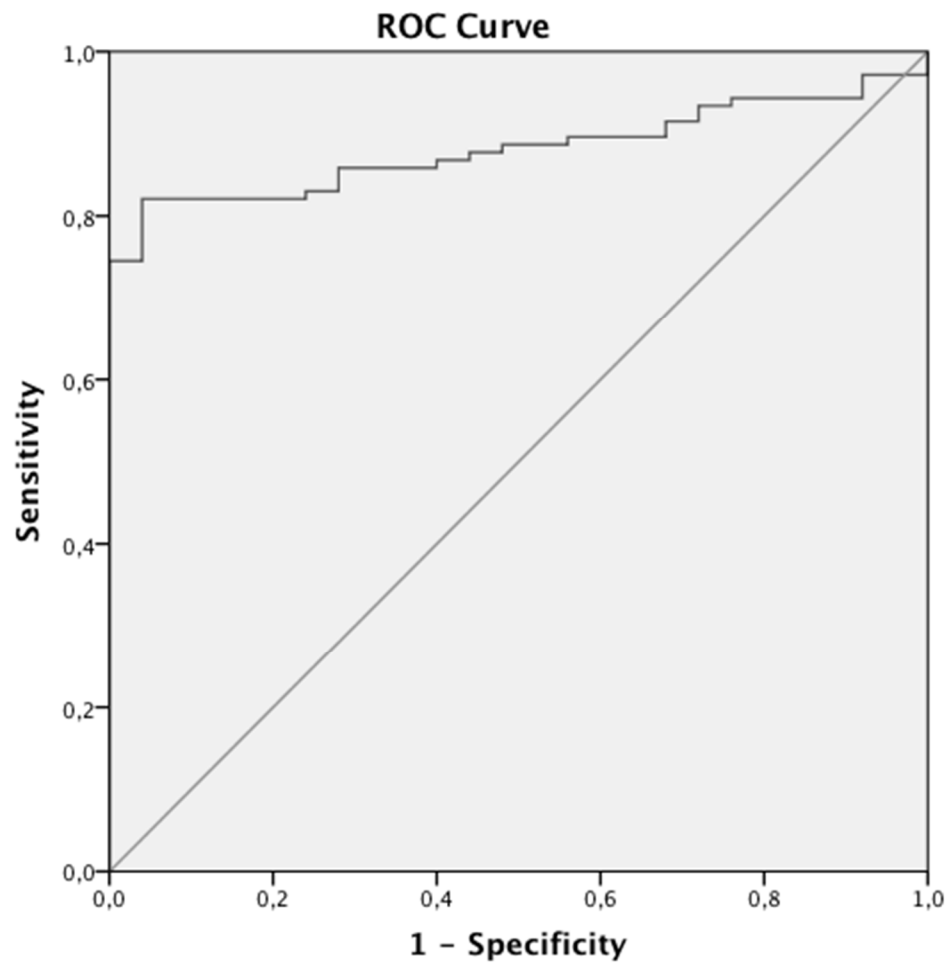


Fig. 8

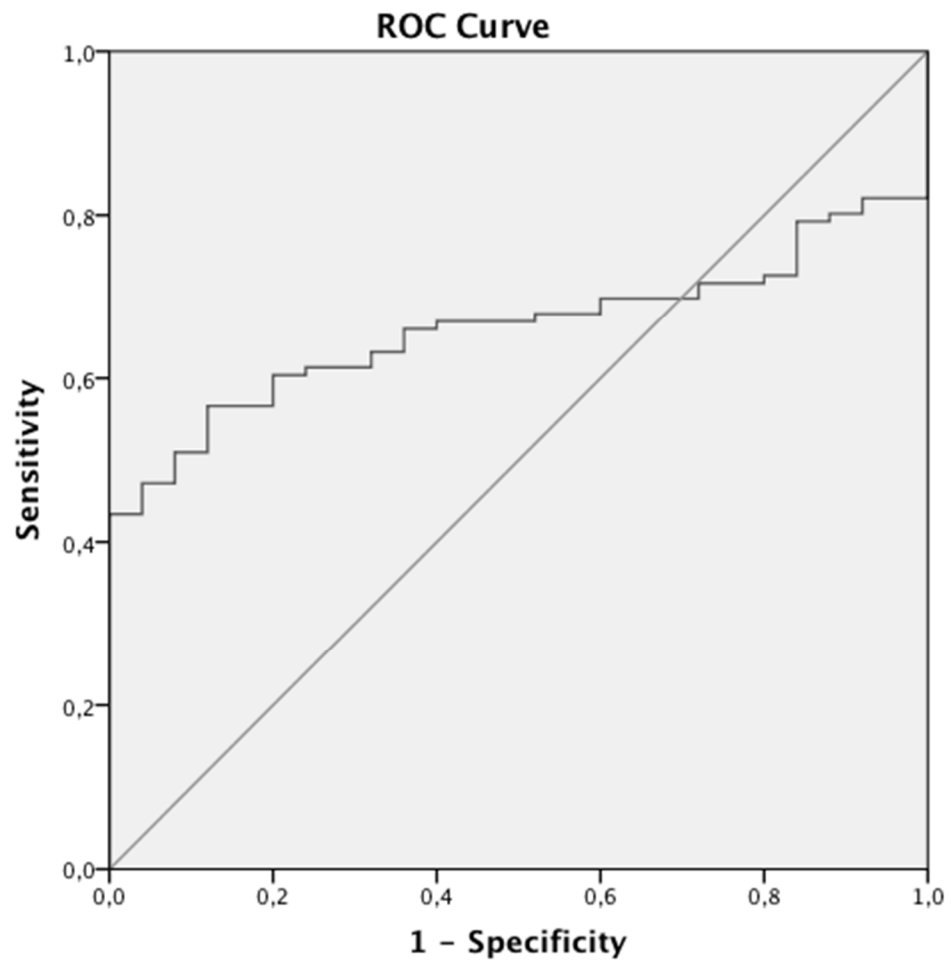


Fig. 9

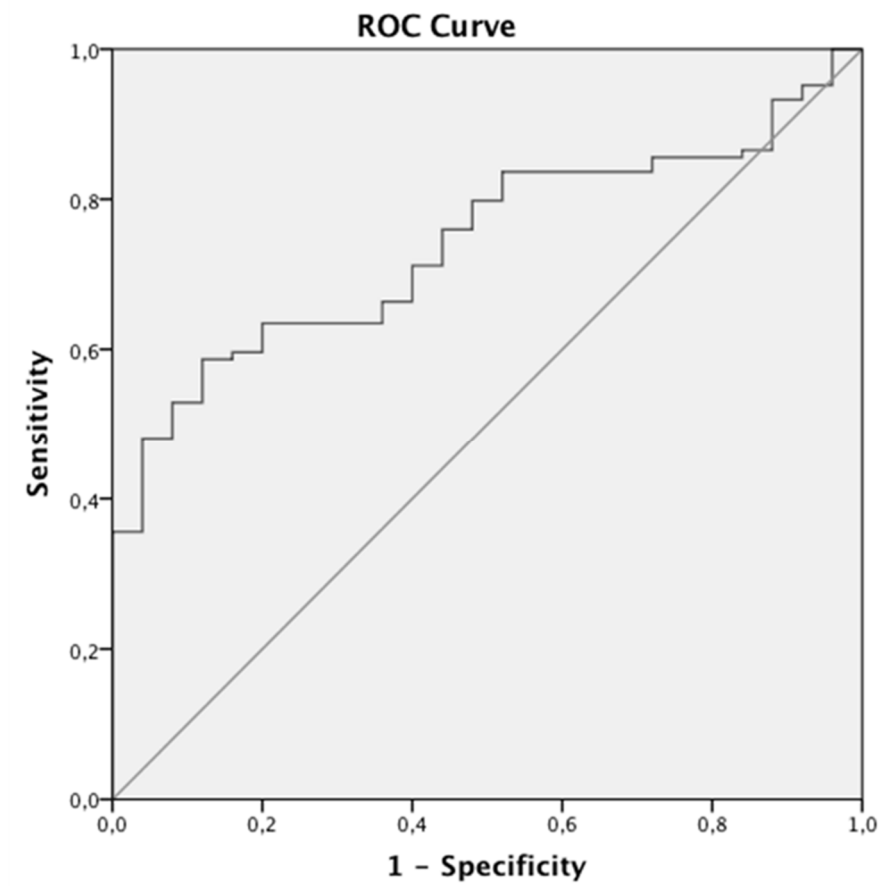


Fig. 10

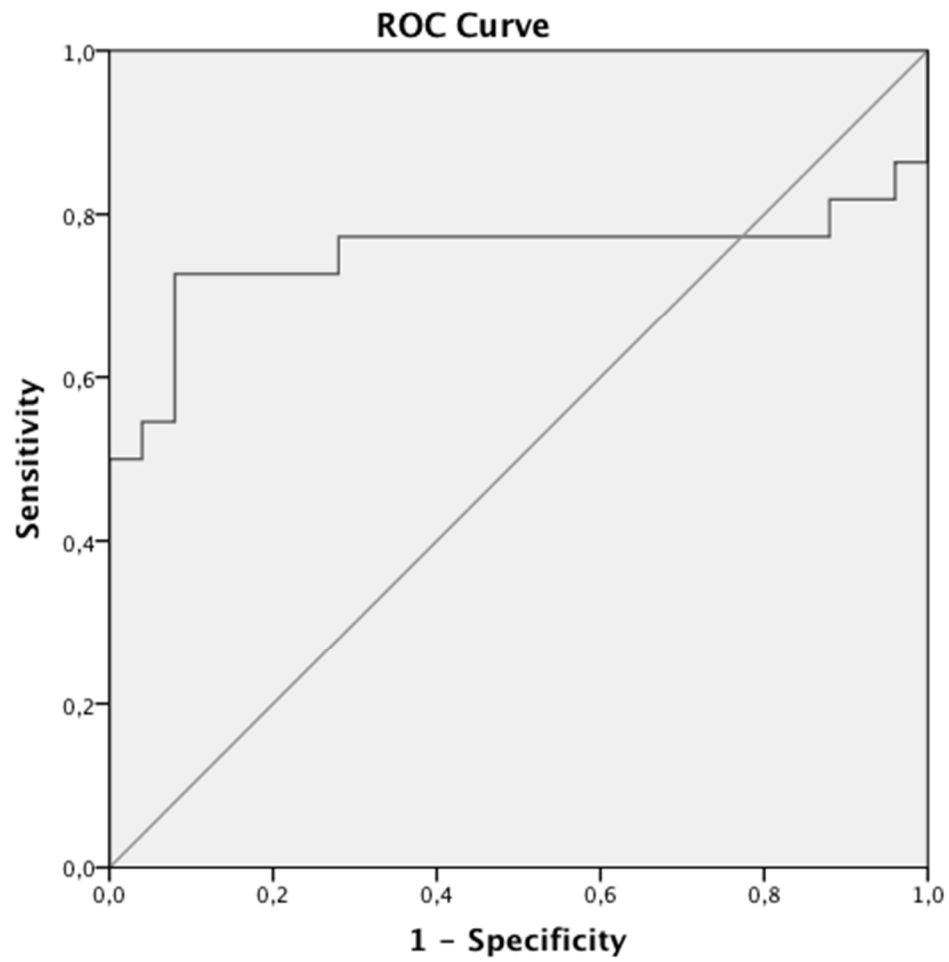


Fig. 11

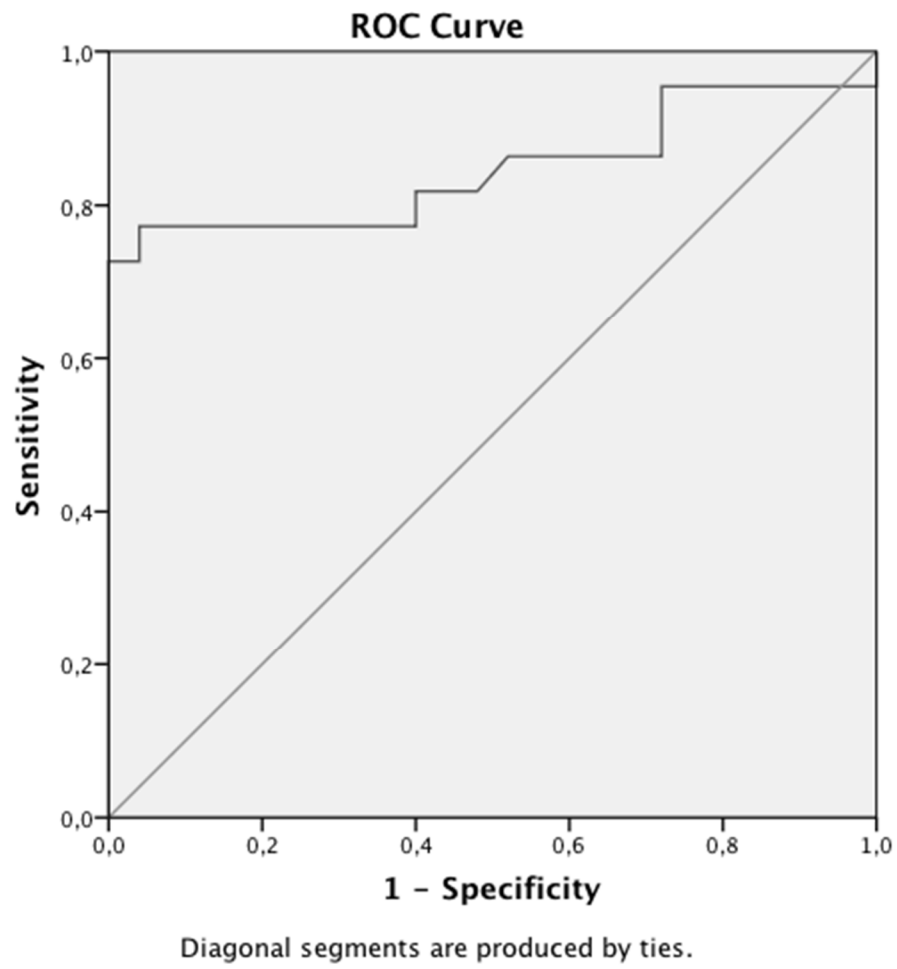


Fig. 12

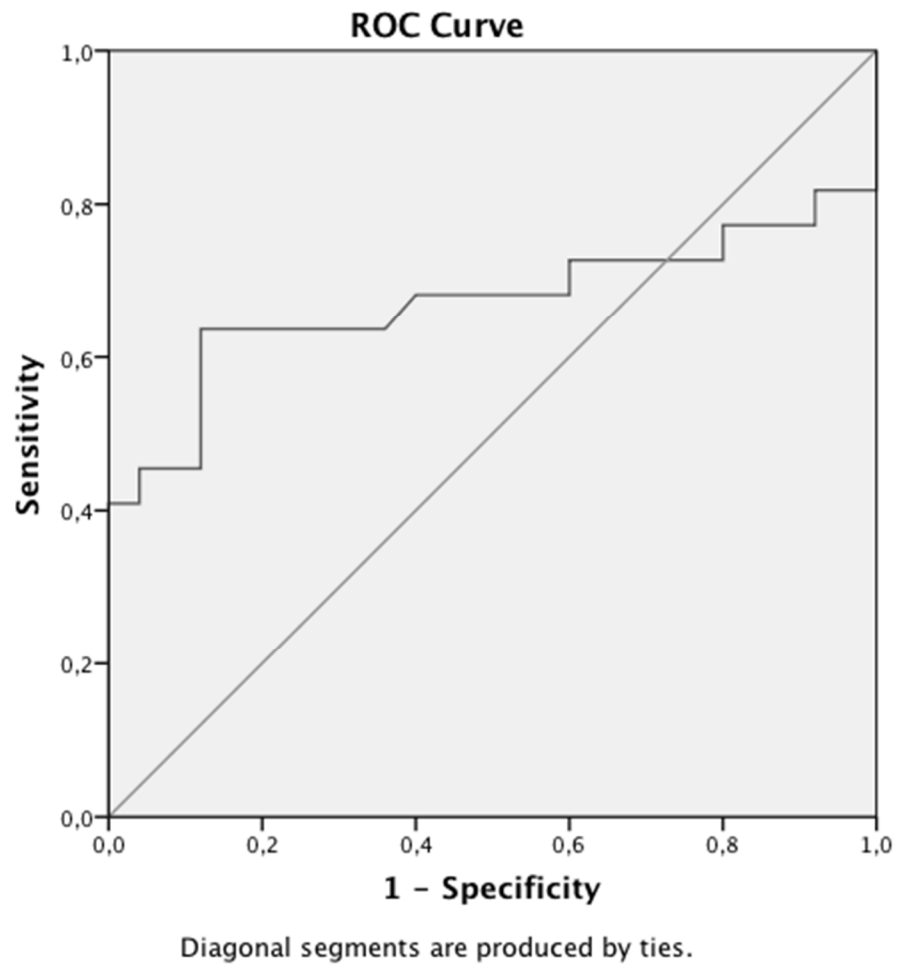


Fig. 13

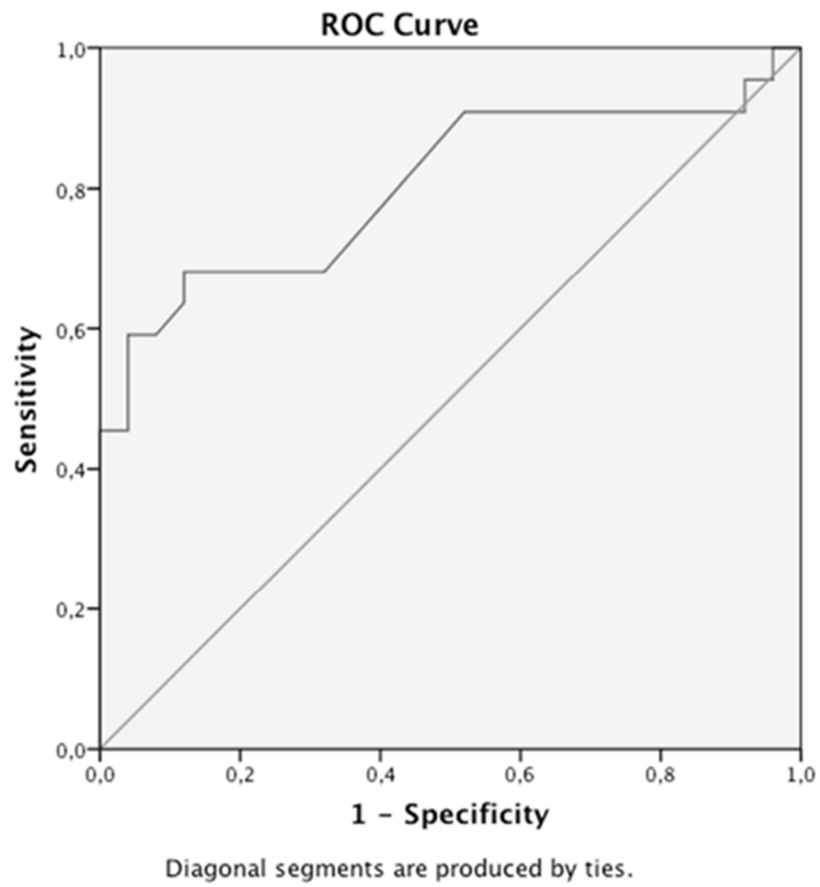


Fig. 14

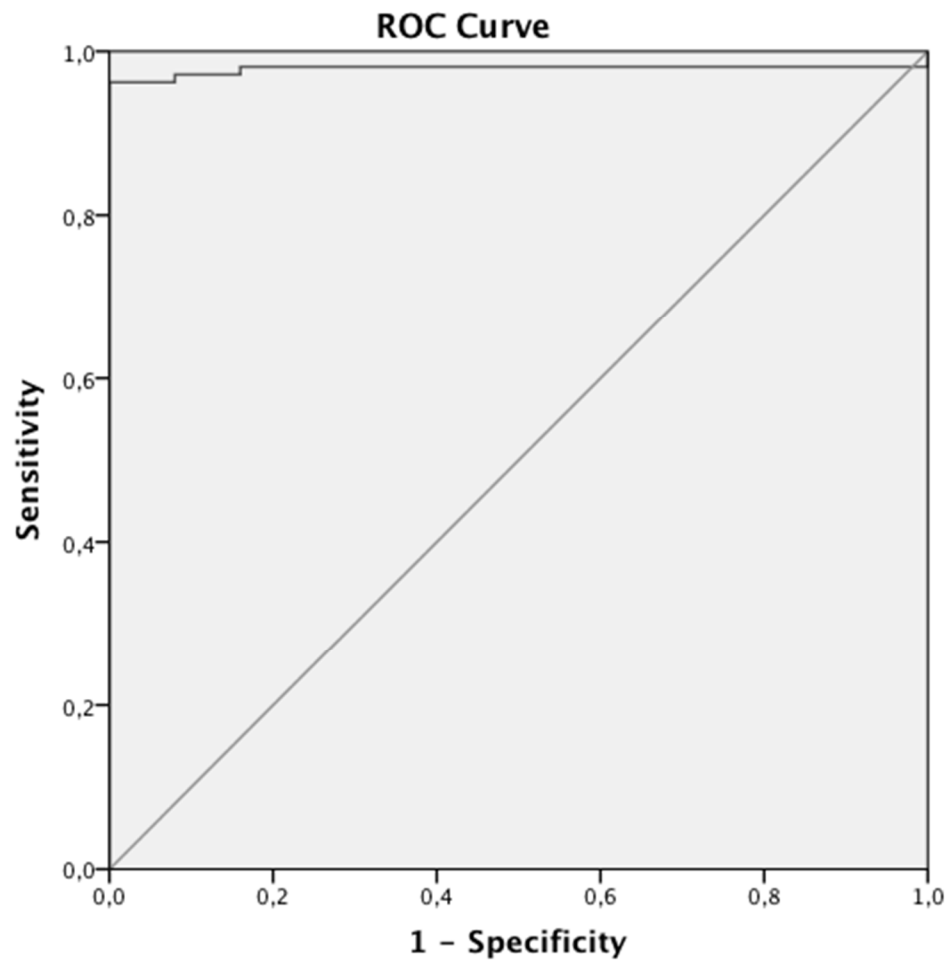


Fig. 15

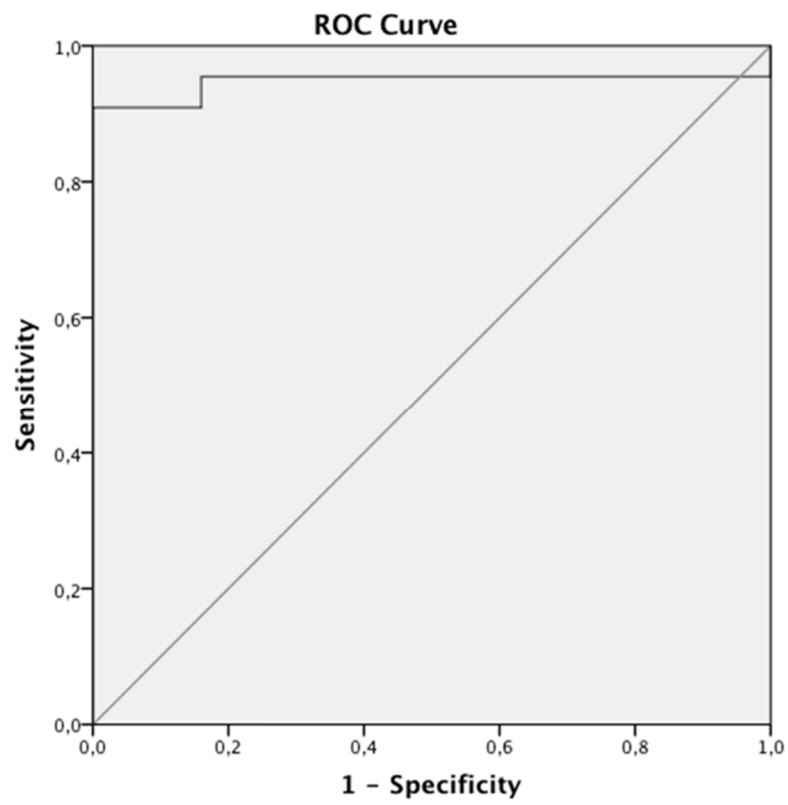


Fig. 16

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Servizo Galego de Saúde (SERGAS)
Universidade de Santiago de Compostela (USC)

<120> USE OF ANTI-CD26 ANTIBODY LEVELS AS AUTOIMMUNE AND/OR
INFLAMMATORY DISEASE BIOMARKERS

<130> 901 050

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 766
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Dipeptidyl peptidase 4
<222> (1)..(766)
<223> membrane form

<400> 1

Met Lys Thr Pro Trp Lys Val Leu Leu Gly Leu Leu Gly Ala Ala Ala
1 5 10 15

Leu Val Thr Ile Ile Thr Val Pro Val Val Leu Leu Asn Lys Gly Thr
20 25 30

Asp Asp Ala Thr Ala Asp Ser Arg Lys Thr Tyr Thr Leu Thr Asp Tyr
35 40 45

Leu Lys Asn Thr Tyr Arg Leu Lys Leu Tyr Ser Leu Arg Trp Ile Ser
50 55 60

Asp His Glu Tyr Leu Tyr Lys Gln Glu Asn Asn Ile Leu Val Phe Asn
65 70 75 80

Ala Glu Tyr Gly Asn Ser Ser Val Phe Leu Glu Asn Ser Thr Phe Asp
85 90 95

Glu Phe Gly His Ser Ile Asn Asp Tyr Ser Ile Ser Pro Asp Gly Gln
100 105 110

Phe Ile Leu Leu Glu Tyr Asn Tyr Val Lys Gln Trp Arg His Ser Tyr
115 120 125

Thr Ala Ser Tyr Asp Ile Tyr Asp Leu Asn Lys Arg Gln Leu Ile Thr
130 135 140

Glu Glu Arg Ile Pro Asn Asn Thr Gln Trp Val Thr Trp Ser Pro Val
145 150 155 160

Gly His Lys Leu Ala Tyr Val Trp Asn Asn Asp Ile Tyr Val Lys Ile
165 170 175

1

ES 2 642 723 A1

Glu Pro Asn Leu Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Trp Thr Gly Lys Glu Asp
 180 185 190
 Ile Ile Tyr Asn Gly Ile Thr Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Val Phe
 195 200 205
 Ser Ala Tyr Ser Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly Thr Phe Leu Ala
 210 215 220
 Tyr Ala Gln Phe Asn Asp Thr Glu Val Pro Leu Ile Glu Tyr Ser Phe
 225 230 235 240
 Tyr Ser Asp Glu Ser Leu Gln Tyr Pro Lys Thr Val Arg Val Pro Tyr
 245 250 255
 Pro Lys Ala Gly Ala Val Asn Pro Thr Val Lys Phe Phe Val Val Asn
 260 265 270
 Thr Asp Ser Leu Ser Ser Val Thr Asn Ala Thr Ser Ile Gln Ile Thr
 275 280 285
 Ala Pro Ala Ser Met Leu Ile Gly Asp His Tyr Leu Cys Asp Val Thr
 290 295 300
 Trp Ala Thr Gln Glu Arg Ile Ser Leu Gln Trp Leu Arg Arg Ile Gln
 305 310 315 320
 Asn Tyr Ser Val Met Asp Ile Cys Asp Tyr Asp Glu Ser Ser Gly Arg
 325 330 335
 Trp Asn Cys Leu Val Ala Arg Gln His Ile Glu Met Ser Thr Thr Gly
 340 345 350
 Trp Val Gly Arg Phe Arg Pro Ser Glu Pro His Phe Thr Leu Asp Gly
 355 360 365
 Asn Ser Phe Tyr Lys Ile Ile Ser Asn Glu Glu Gly Tyr Arg His Ile
 370 375 380
 Cys Tyr Phe Gln Ile Asp Lys Lys Asp Cys Thr Phe Ile Thr Lys Gly
 385 390 395 400
 Thr Trp Glu Val Ile Gly Ile Glu Ala Leu Thr Ser Asp Tyr Leu Tyr
 405 410 415
 Tyr Ile Ser Asn Glu Tyr Lys Gly Met Pro Gly Gly Arg Asn Leu Tyr
 420 425 430
 Lys Ile Gln Leu Ser Asp Tyr Thr Lys Val Thr Cys Leu Ser Cys Glu
 435 440 445

ES 2 642 723 A1

Leu Asn Pro Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Ser Val Ser Phe Ser Lys Glu
 450 455 460

Ala Lys Tyr Tyr Gln Leu Arg Cys Ser Gly Pro Gly Leu Pro Leu Tyr
 465 470 475 480

Thr Leu His Ser Ser Val Asn Asp Lys Gly Leu Arg Val Leu Glu Asp
 485 490 495

Asn Ser Ala Leu Asp Lys Met Leu Gln Asn Val Gln Met Pro Ser Lys
 500 505 510

Lys Leu Asp Phe Ile Ile Leu Asn Glu Thr Lys Phe Trp Tyr Gln Met
 515 520 525

Ile Leu Pro Pro His Phe Asp Lys Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Leu
 530 535 540

Asp Val Tyr Ala Gly Pro Cys Ser Gln Lys Ala Asp Thr Val Phe Arg
 545 550 555 560

Leu Asn Trp Ala Thr Tyr Leu Ala Ser Thr Glu Asn Ile Ile Val Ala
 565 570 575

Ser Phe Asp Gly Arg Gly Ser Gly Tyr Gln Gly Asp Lys Ile Met His
 580 585 590

Ala Ile Asn Arg Arg Leu Gly Thr Phe Glu Val Glu Asp Gln Ile Glu
 595 600 605

Ala Ala Arg Gln Phe Ser Lys Met Gly Phe Val Asp Asn Lys Arg Ile
 610 615 620

Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Thr Ser Met Val Leu
 625 630 635 640

Gly Ser Gly Ser Gly Val Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
 645 650 655

Ser Arg Trp Glu Tyr Tyr Asp Ser Val Tyr Thr Glu Arg Tyr Met Gly
 660 665 670

Leu Pro Thr Pro Glu Asp Asn Leu Asp His Tyr Arg Asn Ser Thr Val
 675 680 685

Met Ser Arg Ala Glu Asn Phe Lys Gln Val Glu Tyr Leu Leu Ile His
 690 695 700

Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Gln Ser Ala Gln Ile Ser
 705 710 715 720

ES 2 642 723 A1

Lys Ala Leu Val Asp Val Gly Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Thr
725 730 735

Asp Glu Asp His Gly Ile Ala Ser Ser Thr Ala His Gln His Ile Tyr
740 745 750

Thr His Met Ser His Phe Ile Lys Gln Cys Phe Ser Leu Pro
755 760 765

<210> 2
<211> 727
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> dipeptidyl peptidase 4
<222> (1)..(727)
<223> soluble form

<400> 2

Arg Lys Thr Tyr Thr Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Asn Thr Tyr Arg Leu
1 5 10 15

Lys Leu Tyr Ser Leu Arg Trp Ile Ser Asp His Glu Tyr Leu Tyr Lys
20 25 30

Gln Glu Asn Asn Ile Leu Val Phe Asn Ala Glu Tyr Gly Asn Ser Ser
35 40 45

Val Phe Leu Glu Asn Ser Thr Phe Asp Glu Phe Gly His Ser Ile Asn
50 55 60

Asp Tyr Ser Ile Ser Pro Asp Gly Gln Phe Ile Leu Leu Glu Tyr Asn
65 70 75 80

Tyr Val Lys Gln Trp Arg His Ser Tyr Thr Ala Ser Tyr Asp Ile Tyr
85 90 95

Asp Leu Asn Lys Arg Gln Leu Ile Thr Glu Glu Arg Ile Pro Asn Asn
100 105 110

Thr Gln Trp Val Thr Trp Ser Pro Val Gly His Lys Leu Ala Tyr Val
115 120 125

Trp Asn Asn Asp Ile Tyr Val Lys Ile Glu Pro Asn Leu Pro Ser Tyr
130 135 140

Arg Ile Thr Trp Thr Gly Lys Glu Asp Ile Ile Tyr Asn Gly Ile Thr
145 150 155 160

Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Val Phe Ser Ala Tyr Ser Ala Leu Trp
165 170 175

ES 2 642 723 A1

Trp Ser Pro Asn Gly Thr Phe Leu Ala Tyr Ala Gln Phe Asn Asp Thr
 180 185 190
 Glu Val Pro Leu Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Ser Asp Glu Ser Leu Gln
 195 200 205
 Tyr Pro Lys Thr Val Arg Val Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Val Asn
 210 215 220
 Pro Thr Val Lys Phe Phe Val Val Asn Thr Asp Ser Leu Ser Ser Val
 225 230 235 240
 Thr Asn Ala Thr Ser Ile Gln Ile Thr Ala Pro Ala Ser Met Leu Ile
 245 250 255
 Gly Asp His Tyr Leu Cys Asp Val Thr Trp Ala Thr Gln Glu Arg Ile
 260 265 270
 Ser Leu Gln Trp Leu Arg Arg Ile Gln Asn Tyr Ser Val Met Asp Ile
 275 280 285
 Cys Asp Tyr Asp Glu Ser Ser Gly Arg Trp Asn Cys Leu Val Ala Arg
 290 295 300
 Gln His Ile Glu Met Ser Thr Thr Gly Trp Val Gly Arg Phe Arg Pro
 305 310 315 320
 Ser Glu Pro His Phe Thr Leu Asp Gly Asn Ser Phe Tyr Lys Ile Ile
 325 330 335
 Ser Asn Glu Glu Gly Tyr Arg His Ile Cys Tyr Phe Gln Ile Asp Lys
 340 345 350
 Lys Asp Cys Thr Phe Ile Thr Lys Gly Thr Trp Glu Val Ile Gly Ile
 355 360 365
 Glu Ala Leu Thr Ser Asp Tyr Leu Tyr Tyr Ile Ser Asn Glu Tyr Lys
 370 375 380
 Gly Met Pro Gly Gly Arg Asn Leu Tyr Lys Ile Gln Leu Ser Asp Tyr
 385 390 395 400
 Thr Lys Val Thr Cys Leu Ser Cys Glu Leu Asn Pro Glu Arg Cys Gln
 405 410 415
 Tyr Tyr Ser Val Ser Phe Ser Lys Glu Ala Lys Tyr Tyr Gln Leu Arg
 420 425 430
 Cys Ser Gly Pro Gly Leu Pro Leu Tyr Thr Leu His Ser Ser Val Asn
 435 440 445
 Asp Lys Gly Leu Arg Val Leu Glu Asp Asn Ser Ala Leu Asp Lys Met
 5

ES 2 642 723 A1

450		455		460	
Leu 465	Gln	Asn	Val	Gln	Met 470
				Pro	Ser
				Lys	Lys
				Leu 475	Asp
				Phe	Ile
				Ile	Leu 480
Asn	Glu	Thr	Lys	Phe 485	Trp
				Tyr	Gln
				Met	Ile 490
				Leu	Pro
				Pro	His
				Phe 495	Asp
Lys	Ser	Lys	Lys 500	Tyr	Pro
				Leu	Leu
				Leu 505	Asp
				Val	Tyr
				Ala	Gly 510
				Pro	Cys
Ser	Gln	Lys 515	Ala	Asp	Thr
				Val	Phe 520
				Arg	Leu
				Asn	Trp
				Ala 525	Thr
				Tyr	Leu
Ala	Ser 530	Thr	Glu	Asn	Ile
				Ile 535	Val
				Ala	Ser
				Phe	Asp 540
				Gly	Arg
				Gly	Ser
Gly 545	Tyr	Gln	Gly	Asp	Lys 550
				Ile	Met
				His	Ala
				Ile 555	Asn
				Arg	Arg
				Leu	Gly 560
Thr	Phe	Glu	Val	Glu 565	Asp
				Gln	Ile
				Glu	Ala 570
				Ala	Arg
				Gln	Phe
				Ser 575	Lys
Met	Gly	Phe	Val 580	Asp	Asn
				Lys	Arg
				Ile 585	Ala
				Ile	Trp
				Gly	Trp 590
				Ser	Gly
				Ser 605	Gly
				Val	Phe
Gly	Gly	Tyr 595	Val	Thr	Ser
				Met	Val 600
				Leu	Gly
				Ser	Gly
				Ser 605	Gly
				Val	Phe
Lys	Cys 610	Gly	Ile	Ala	Val
				Ala 615	Pro
				Val	Ser
				Arg	Trp 620
				Glu	Tyr
				Tyr	Asp
Ser 625	Val	Tyr	Thr	Glu	Arg 630
				Tyr	Met
				Gly	Leu
				Pro 635	Thr
				Pro	Glu
				Asp	Asn 640
Leu	Asp	His	Tyr	Arg 645	Asn
				Ser	Thr
				Val	Met 650
				Ser	Arg
				Ala	Glu
				Asn 655	Phe
Lys	Gln	Val	Glu 660	Tyr	Leu
				Leu	Ile
				His 665	Gly
				Thr	Ala
				Asp	Asp 670
				Asn	Val
His	Phe	Gln 675	Gln	Ser	Ala
				Gln	Ile 680
				Ser	Lys
				Ala	Leu
				Val 685	Asp
				Val	Gly
				Ile	Ala
Val	Asp	Phe	Gln	Ala	Met
				Trp 695	Tyr
				Thr	Asp
				Glu	Asp 700
				His	Gly
				Ile	Ala
Ser 705	Ser	Thr	Ala	His	Gln 710
				His	Ile
				Tyr	Thr
				His 715	Met
				Ser	His
				Phe	Ile 720
Lys	Gln	Cys	Phe	Ser 725	Leu
				Pro	



- ②① N.º solicitud: 201630620
②② Fecha de presentación de la solicitud: 12.05.2016
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/53** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 9638550 A1 (DANA FARBER CANCER INST INC) 05/12/1996, Página 42, líneas 7-21; pág. 33, líneas 88-12, reivindicaciones 1, 5, 8 y 12.	1-8, 15-22
A		9-14
X	Cuchacovich M et al. "Characterization of human serum dipeptidyl peptidase iv (cd26) and analysis of its autoantibodies in patients with rheumatoidarthritis and other autoimmune diseases" Clinical and experimental rheumatology Italy. 31/10/2001, Vol. 19, N° 6, Páginas 673 - 680 [en línea][recuperadoel 16/10/2017]. ISSN ISSN 0392-856X (Print), <DOI:pubmed:11791639>	9
A	US 2006177886 A1 (HAZATO TADAHIKO et al.) 10/08/2006, Párrafos [0005] [0049], reivindicaciones 1 y 11.	1-29
A	Hosono O et al. CD26: "A key molecule in immuneregulation and autoimmune diseases" (resumen). [en línea] [Recuperado el 16/10/2017]. Recuperado de <EPOQUE base de datos WPI>. Modern Rheumatology 2003 jp. 30/11/2002, Vol. 13, N° 3, Páginas 199 - 204 ISSN 1439-7595 (print), <DOI: doi:10.1007/s10165-003-0224-y>	1-29

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
10.10.2017

Examinador
M. L. Serriñá Ramírez

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, PATENW, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, NPL, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.10.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-29	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 10, 11, 23-29	SI
	Reivindicaciones 1-9, 12-22	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 9638550 A1 (DANA FARBER CANCER INST INC)	05.12.1996
D02	Cuchacovich M et al. "Characterization of human serum dipeptidyl peptidase iv (cd26) and analysis of its autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases". Clinical and experimental rheumatology Italy. Vol. 19, N° 6, Páginas 673 - 680 [en línea][recuperado el 16/10/2017]. ISSN 0392-856X (Print), <DOI: pubmed:11791639>	31.10.2001
D03	US 2006177886 A1 (HAZATO TADAHICO et al.)	10.08.2006
D04	Hosono O et al. CD26: "A key molecule in immune regulation and autoimmune diseases". (resumen). [en línea] [recuperado el 16/10/2017]. Recuperado de <EPOQUE base de datos WPI>. Modern Rheumatology 2003 jp. Vol. 13, N° 3, Páginas 199 – 204; ISSN 1439-7595 (print), <DOI:10.1007/s10165-003-0224-y>	30.11.2002

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 24/2015)**

Ninguno de los documentos citados reúne todas las características técnicas de las reivindicaciones 1-29, por lo que dichas reivindicaciones cumplen el requisito de novedad (Art. 6.1 LP).

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 24/2015)**1. Reivindicaciones 1-9 y 12-22**

Se considera que el documento más cercano del estado de la técnica es el documento D01, que divulga una nueva glicoproteína DPPIV/CD26, (en adelante los numerales citados se refieren a D01), que se puede usar para el tratamiento de la inmunosupresión, p.ej. en enfermedades autoinmunes como lupus y artritis reumatoide. Se describe la detección de anticuerpos frente a DPPIV/CD26 en suero/plasma, y se asocian su aumento con la activación de células T y con enfermedades como el lupus eritematoso y la artritis reumatoide (véase pág. 42, líneas 7-21, reivindicaciones 1, 5, 8 y 12). Así mismo, se hace especial referencia a la utilización específica de anticuerpos anti-IgG (Pág. 56, líneas 5-17).

La principal diferencia entre la reivindicación 1 y D01 es la utilización de la detección de los citados anticuerpos para un método de cribado, así como la comparación de los niveles de anticuerpo en la muestra con los niveles en sujetos sanos. Una vez establecida explícitamente la relación entre incremento de los niveles de anticuerpos y las enfermedades inflamatorias descritas, el diseño del método indicado y la comparación entre los valores en suero con lo de un individuo sano son rutinas de sobra conocidas para cualquier experto en la materia a la vista de D01. Por tanto, se considera que la reivindicación 1 carece de actividad inventiva (Art. 8.1).

Las reivindicaciones 2-8 no añaden ninguna característica técnica adicional a la reivindicación 1, simplemente constituyen diferentes aplicaciones del mismo método básico, usado para diversos fines. Consecuentemente, las citadas reivindicaciones carecen igualmente de actividad inventiva (Art. 8.1).

Con respecto a la reivindicación 9, D02 (véase Pág. 28, líneas 1-16), hace referencia a la determinación de anticuerpos anti-CD26 IgA, IgG e IgM, y al valor diagnóstico de los anticuerpos frente al isotipo IgA para enfermedades inflamatorias, concretamente artritis reumatoide, lupus y síndrome de Sjögren, por lo que cualquier experto en la materia combinaría la determinación de los anticuerpos G y A conjuntamente, para alcanzar la solución propuesta en dicha reivindicación. Por tanto, la reivindicación 9 carecería de actividad inventiva (Art. 8.1).

En cuanto a la reivindicación 15, la utilización de anticuerpos anti-CD26 solubles recombinantes se encuentra igualmente descrita en D01 (véase pág. 33, 88-12), por lo que dicha reivindicación no cumpliría tampoco el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1).

Las reivindicaciones 10-14 y 16-22, según se encuentran redactadas, son directa o indirectamente dependientes de las reivindicación 1 y no añaden ninguna característica técnica que revista en sí misma actividad inventiva, ya que todos los marcadores, parámetros y fármacos citados, son ampliamente conocidos en el estado de la técnica previo. Dichas reivindicaciones carecen, por tanto, de actividad inventiva (Art. 8.1).

2. Reivindicaciones 10, 11 y 23-29

La reivindicación 10 hace referencia a la determinación simultánea de anticuerpos anti-CD26 IgG junto con IgM, IgA o IgM y IgA. No se ha encontrado ningún documento en el que se realice la determinación simultánea de tales anticuerpos, por lo que se considera que la reivindicación tendría actividad inventiva (Art. 8.1). La reivindicación 11 especifica un intervalo concreto de incremento de la concentración de los anticuerpos anti-CD26, que no se encuentra descrito en ninguno de los documentos recuperados, por lo que se considera que estaría dotada igualmente de actividad inventiva (Art. 8.1).

La reivindicación 23 se refiere a un kit que comprende reactivos para la determinación simultánea de anticuerpos anti-CD26 de los isotipos IgG e IgM simultáneamente. Por idénticas razones a las reseñadas en la reivindicación 10, la reivindicación 23 tendría actividad inventiva (Art. 8.1).

Las reivindicaciones 24-29 dependen directa o indirectamente de la reivindicación 23. Consecuentemente, estarán dotadas de actividad inventiva (Art. 8.1).

Hay que hacer notar que las reivindicaciones 12-22 podrían estar dotadas de actividad inventiva si se las hiciese depender directa o indirectamente de las reivindicaciones 10 y 11, que tienen actividad inventiva.