

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 833**

51 Int. Cl.:

G01N 33/545 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2011 PCT/IL2011/000711**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2012 WO12032511**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2011 E 11823155 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2614372**

54 Título: **Kit para controlar, detectar y estadificar GVHD**

30 Prioridad:

18.01.2011 US 201161433540 P
07.09.2010 US 380337 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2018

73 Titular/es:

MARX, STEPHEN G. (100.0%)
3A Ma'avar Hamitleh
97761 Jerusalem, IL

72 Inventor/es:

MARX, STEPHEN G.

74 Agente/Representante:

CAMPello ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 692 833 T3

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

DESCRIPCIÓN

Kit para controlar, detectar y estadificar GVHD

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Campo de la invención

La presente invención se encuentra en el campo de los kits de diagnóstico y reguladores para el tratamiento de afecciones asociadas con la proliferación celular patológica. Más específicamente, la invención está adaptada para medir y regular los niveles de activación e inactivación de la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK-3) como un marcador de la proliferación de linfocitos T, especialmente en afecciones tal como la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD).

15 2. Técnica antecedente

La glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK-3) es una serina/treonina cinasa que se sabe que actúa como un interruptor regulador aguas abajo que determina la salida de numerosas rutas de señalización iniciadas por diversos estímulos. A través de estas rutas, GSK-3 desempeña un papel central en la proliferación celular y la apoptosis. La capacidad de detectar el estado de activación de la GSK-3 y, si es necesario de regularlo, permitirá una mayor comprensión y capacidad para tratar y diagnosticar enfermedades relacionadas con la proliferación celular y la apoptosis.

En muchas afecciones relacionadas con la respuesta inmune, incluyendo rechazo tisular, inflamación, infección y GVHD, hay un cambio notable en la proliferación celular, en particular, un aumento en la proliferación de linfocitos T.

La incidencia de GVHD ha aumentado sustancialmente en los últimos años. El número de trasplantes alogénicos de células madre hematopoyéticas (TCMH) que se producen anualmente sigue aumentando cada año. GVHD también puede aparecer ocasionalmente como una complicación de la transfusión de sangre. Clínicamente, se sospecha el diagnóstico de GVHD cuando el paciente desarrolla uno o más de los siguientes síntomas observables: dermatitis (erupción cutánea), ampollas cutáneas, dolor abdominal con o sin diarrea, náuseas y vómitos persistentes, hepatitis (con elevación de bilirrubina y/o enzimas hepáticas) (Jacobsohn D A y Vogelsang G B 2007). Las observaciones clínicas junto con las técnicas de diagnóstico actuales consumen mucho tiempo y requieren un muestreo de tejido invasivo, que implica biopsias de tejido obtenidas de un órgano involucrado para confirmar y diagnosticar la GVHD. Aunque las biopsias son la única forma de diagnosticar correctamente GVHD en la actualidad, el diagnóstico se determina solo después de que los linfocitos T ya están atacando los tejidos del huésped y el proceso de GVHD ha alcanzado la fase 3 del trastorno. Los procedimientos de biopsia para obtener tejido también son invasivos e incurrir en demoras de 24 a 48 horas antes de que se pueda realizar un diagnóstico. Además, un diagnóstico inequívoco no siempre es posible con las biopsias, y el diagnóstico de los síntomas clínicos no es fiable, dado que otras afecciones posteriores al trasplante pueden presentarse de una manera similar. Se han descrito ciertos biomarcadores para GVHD en la técnica anterior. Por ejemplo, el documento EP 2 163 896 muestra que CCL8 es un marcador para el diagnóstico temprano de GVHD.

Por lo tanto, existe la necesidad desde hace mucho tiempo de proporcionar un método rápido, fiable, relativamente no invasivo para detectar GVHD y otras afecciones patológicas que impliquen la proliferación celular en los estadios tempranos del proceso de la enfermedad.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de los kits de diagnóstico y reguladores y, más específicamente, a un kit de diagnóstico y regulador para la enfermedad de injerto contra huésped.

La presente invención se refiere a un método para detectar GVHD en un mamífero que incluye un ser humano de acuerdo con la reivindicación independiente adjunta 1 y las reivindicaciones dependientes adjuntas 2-8.

La presente invención también se refiere a un uso de un kit en el diagnóstico de GVHD de acuerdo con la reivindicación independiente adjunta 9 y la reivindicación dependiente adjunta 10.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La invención se describe en el presente documento, a modo de ejemplo solamente, con referencia a los dibujos adjuntos. Los detalles mostrados son solo a modo de ejemplo y para los fines del análisis ilustrativo de las realizaciones preferidas de la presente invención solamente. La descripción tomada con los dibujos debe hacer evidente para los expertos en la técnica cómo se pueden poner en práctica varias formas de la invención.

5

En los dibujos:

La Figura 1 es una ilustración pictórica de las subunidades GSK3 α y GSK3 β y sus sitios conocidos de activación e inactivación;

10

la Figura 2 es un diagrama de flujo que conecta GSK3 β con GVHD;

la Figura 3 es una ilustración pictórica del proceso de la enfermedad en GVHD;

la Figura 4A es una representación gráfica de los niveles de expresión de la proteína GSK-3 β (p-GSK-3 β) fosforilada en ser 9 en muestras de bazo;

15

la Figura 4B es una representación gráfica de los niveles de expresión de la proteína GSK-3 β total en muestras de bazo;

la Figura 5 es una representación gráfica de los niveles de expresión de la proteína PKC fosforilada (p-PKC) en muestras de bazo;

la Figura 6A es una representación gráfica de los niveles de expresión de la proteína GSK-3 β (p-GSK-3 β) fosforilada en ser 9 en muestras de sangre; y

20

la Figura 6B es una representación gráfica de los niveles de expresión de la proteína GSK-3 β total en muestras de sangre.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 La presente invención resuelve muchos de los problemas de los métodos y sistemas actuales para controlar pacientes que padecen afecciones asociadas con la proliferación celular patológica y la apoptosis celular patológica, especialmente GVHD.

Por lo tanto, una realización preferida de la presente invención es divulgar un kit de diagnóstico, capaz de detectar el nivel de expresión de la glucógeno sintasa cinasa 3 β (GSK-3 β). En esta realización, el nivel de expresión de GSK-3 β es un indicador de GVHD en el paciente.

30

Se sabe ahora que GSK-3 β actúa como un interruptor regulador aguas abajo que determina la salida de numerosas rutas de señalización iniciadas por diversos estímulos (Frame y Cohen 2001, Grimes y Jope 2001, Woodgett 2001 y Doble y Woodgett 2003).

35

El estado de activación de la GSK-3 β , los niveles de expresión de la GSK-3 β o el sitio en la GSK-3 β responsable de la activación o desactivación de la misma se usan para detectar y controlar la GVHD.

Ahora se hace referencia a la Figura 1 en los dibujos, que muestra las dos subunidades de GSK-3, GSK-3 α 10 y GSK-3 β 15 y sus sitios de fosforilación. Se hace referencia específica a la subunidad GSK-3 β , en la que se muestran los sitios de fosforilación conocidos, incluyendo la serina 9 (S9) 16 y la tirosina 216 (Y216) 17. En esta realización, el estado fisiológico normal de la GSK-3 β está en un estado activo no fosforilado o desfosforilado. En esta realización, la fosforilación en serina 9 desactiva la GSK-3 β , que se puede identificar y cuantificar de acuerdo con los métodos descritos inmediatamente en la descripción. La fosforilación en serina 9 se asocia con diversas otras proteínas, incluyendo, pero sin limitación, monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), fosfoinositida 3-cinasa (PI3K), 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP₂), proteína cinasa A (PKA) y Akt (familia de la serina/treonina proteína cinasa).

45

En una realización adicional de la presente invención, la inactivación de GSK-3 β también puede ocurrir a través de la ruta de señalización Wnt. La activación de Wnt desactiva la GSK-3 β a través de un sitio de inactivación independiente de la fosforilación en serina 9 y se identifica y se cuantifica a través de la medición de los cambios en los niveles de β -catenina no fosforilada. En una realización adicional, la activación de la GSK-3 β se realiza a través de desfosforilación o a través de fosforilación de tirosina 216 (Y216). La fosforilación de GSK-3 β se puede identificar y cuantificar a través de cambios en el peso molecular de la GSK-3 β utilizando métodos descritos inmediatamente en la descripción. En un aspecto de esta realización, el kit de diagnóstico de la presente invención usa anticuerpos para identificar y cuantificar los niveles de expresión de GSK-3 β .

55

Es una realización preferida de la presente invención que GSK-3 β sea una molécula de diagnóstico y/o terapéutica incorporada en un kit de diagnóstico y/o terapéutico para la detección y control de GVHD.

Una realización preferida del kit de diagnóstico de la presente invención es caracterizar la actividad de GSK3 β mediante la detección y cuantificación de los niveles de proteína de GSK3 β total y GSK3 β fosforilada en ser 9. También en esta realización, el kit de diagnóstico es capaz de detectar y cuantificar la inactivación de GSK3 β a través del nivel de proteína C cinasa activada (PKC) y la inactivación de GSK3 β a través de Wnt activado.

Por lo tanto, es una realización preferida de la presente invención identificar marcadores moleculares asociados a GSK-3 β , por ejemplo, proteínas que están afectadas por la ruta de Wnt activada o estimuladas por PKC activada para aumentar la precisión de la detección de GVHD, el sitio en la GSK-3 β que se ve afectado por la ruta Wnt activada y el sitio en la GSK-3 β que es estimulado por la PKC activada.

La proliferación y la apoptosis celular anormal es una característica principal de la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) y otras afecciones relacionadas con las respuestas inmunitarias en las que existe proliferación de linfocitos T como parte de la respuesta del paciente a un cuerpo o cuerpos extraños, como se muestra en la Figura 2 de los dibujos. En esta realización y en otras realizaciones preferidas, la molécula y el kit de diagnóstico se utilizan y tienen aplicaciones en la GVHD. Una realización adicional de la presente invención es que la regulación del estado de activación de GSK-3 β mediante la identificación y cuantificación de los niveles de expresión y el estado de inactivación y activación de GSK-3 β y sus rutas asociadas se adapta para regular y controlar la GVHD. En esta realización, el nivel de expresión de GSK-3 β se detecta y se cuantifica mediante el kit de diagnóstico de la presente invención.

Un kit de diagnóstico capaz de identificar GVHD en al menos la fase 2 de la enfermedad mediante la identificación y cuantificación del estado de activación y expresión de GSK-3 β , es una realización adicional de la presente invención. En esta realización, el kit de diagnóstico mide un rango de parámetros asociados con los estados de activación de GSK-3 β y las rutas asociadas, y compara la desviación de las mediciones estándar tomadas de sujetos sanos para determinar la extensión del progreso de la GVHD y hacer el diagnóstico apropiado de la GVHD.

El kit de diagnóstico de la presente invención está adaptado para detectar el inicio temprano de GVHD examinando los cambios en la actividad de GSK-3 β midiendo o determinando los niveles de expresión de GSK-3 β y proteínas relacionadas. Además, en esta realización, el kit de diagnóstico y los métodos de la presente invención podrán determinar la causa de la GVHD con respecto a la proliferación de linfocitos T y la apoptosis determinando cómo la GSK-3 β regula la proliferación y la apoptosis mencionadas anteriormente. En este aspecto de la realización preferida, la información proporcionada por el kit de diagnóstico se utiliza para determinar el tratamiento más eficaz para la GVHD a través de la regulación del estado de activación y/o inactivación de la GSK-3 β .

Una realización preferida adicional de la presente invención es que el kit de diagnóstico está adaptado para detectar perfiles de proteínas específicos y únicamente característicos de la GVHD para poder realizar un diagnóstico correcto y preciso de la GVHD. En esta realización, el perfil de proteína único evita el diagnóstico de GVHD de falso positivo.

Por lo tanto, es una realización preferida de la presente invención que GSK-3 β actúe como una molécula reguladora y terapéutica en un kit terapéutico o farmacéutico en aplicaciones que incluyen, pero sin limitación, GVHD y rechazo tisular.

Ahora se hace referencia a la Figura 3 en los dibujos, en los que se muestran 3 fases de la progresión de la enfermedad por GVHD. En la fase I **400**, las células presentadoras de antígeno (APC) se activan, en el proceso del régimen de acondicionamiento del receptor **401**, el tejido huésped **402** se daña **403**, lo que provoca la liberación de citocinas inflamatorias **404** tal como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-6 (IL-6) y complejos inmunes de lipopolisacáridos (LPS). El aumento de los niveles de estas citocinas conduce a la activación de las APC huésped. En la fase II de GVHD **410** se produce la activación de los linfocitos T donantes, las APC huésped **411** activan los linfocitos T donantes **412**, esto puede evitarse por los linfocitos T reguladores (Treg) **413**. El posterior aumento de la supervivencia (es decir, disminución de la apoptosis), proliferación, migración **416** y diferenciación de los linfocitos T activados en la fase II de la GVHD produce efectores adicionales que median en el daño tisular adicional, incluyendo linfocitos T citotóxicos, células asesinas naturales (NK), TNF α e IL-1. El LPS que se ha filtrado a través de la mucosa intestinal dañada **415** desencadena la producción adicional de TNF α . El TNF α puede dañar el tejido directamente al inducir necrosis y apoptosis en la piel y el tracto gastrointestinal a través de los receptores de TNF o la ruta de Fas. El TNF α desempeña un papel directo en el daño intestinal por GVHD que amplifica aún más el daño en la piel, el hígado y los pulmones en una "tormenta de citocinas". Además, los linfocitos T auxiliares de tipo 1 (Th1) **414** también se liberan en la fase II para facilitar la respuesta inmune liberando citocinas

y ayudando a presentar antígenos a los linfocitos T. En la fase III de GVHD **420**, los linfocitos T se dirigen al tejido huésped para su destrucción con una variedad de efectores celulares e inflamatorios. Las células diana **421** experimentan apoptosis y los linfocitos T que expresan CD4 **423**, CD8 **422** y CTL están presentes en la respuesta inmune. Los macrófagos **424** están mediados por LPS e interferón- γ (IFN- γ) en la fase 3 del proceso de la enfermedad por GVHD. Una vez activados, los macrófagos inician una cascada de respuestas inflamatorias, incluyendo la liberación de mediadores de la lesión tisular, que afectan en particular a los tejidos y órganos que experimentan una proliferación constante, tal como el tracto gastrointestinal y la piel.

Es una realización de la presente invención que un kit de diagnóstico capaz de detectar y cuantificar la expresión y el estado de activación del GSK-3 β (niveles de activación de GSK-3 β y niveles de inactivación de GSK-3 β) sea capaz de diagnosticar GVHD durante la fase II de la enfermedad, en el estadio en que se producen la proliferación de linfocitos T y la migración. El nuevo kit de diagnóstico es capaz de diagnosticar la GVHD en una etapa relativamente temprana antes de que ocurra un daño tisular extenso, de manera rápida y relativamente no invasiva.

En una realización adicional de la presente invención, el kit de diagnóstico para GVHD es capaz de determinar el estado de GSK-3 β según se mide examinando los niveles de expresión de GSK-3 β . El kit de diagnóstico de la presente invención está adaptado para el diagnóstico preciso y diferencial de la GVHD mediante la detección adicional de perfiles de proteínas o ARN únicos para la GVHD, a fin de prevenir el diagnóstico erróneo con otras afecciones que implican la proliferación y activación de linfocitos T.

En otra realización de la invención, se usa un chip de proteína que utiliza una matriz de anticuerpos, biomarcadores o antígenos unidos a un portaobjetos de vidrio o sustrato equivalente para determinar los niveles de expresión de diferentes proteínas relevantes para GVHD en una muestra dada.

En otra realización de la invención, se usa un kit de diagnóstico basado en un chip de proteína para diagnosticar la GVHD antes de la aparición de síntomas clínicos. En ciertas realizaciones, el kit contiene un chip de proteína hecho a medida que comprende anticuerpos que están adaptados para controlar el estado de activación y/o el nivel de expresión de GSK-3 β , rutas relacionadas, marcadores de apoptosis, marcadores de proliferación y otras moléculas biológicas y bioquímicas. Dichas moléculas candidatas pueden predeterminarse y analizarse mediante transferencia Western, FACS y otras técnicas de huellas moleculares.

En otras realizaciones preferidas de la invención, el establecimiento del kit de diagnóstico de GVHD y su eficacia se prueban mediante las siguientes fases:

- Modelo de ratón de GVHD: Se utilizan muestras de ratones para determinar el conjunto de anticuerpos que se cargan en el chip de proteína. El chip mencionado anteriormente se prueba entonces en muestras de ratón.
- Ensayos clínicos: Se utilizan para determinar la eficacia del chip de proteína (prototipo de kit de diagnóstico) y para predecir el desarrollo de GVHD en pacientes humanos con trasplante.

Para comprender la invención y ver cómo se puede implementar en la práctica, ahora se describirá una pluralidad de realizaciones preferidas, solo a modo de ejemplo no limitativo, con referencia a los siguientes ejemplos.

Ahora se hace referencia a experimentos realizados en un modelo de ratón para determinar la participación de GSK-3 β y otras proteínas de rutas relacionadas en GVHD y su uso potencial como marcadores para el diagnóstico de GVHD en un estadio temprano de la enfermedad.

Objetivo:

Demostrar que los niveles de GSK-3 β y proteínas de rutas relacionadas se pueden usar como marcadores para el diagnóstico de GVHD en un estadio temprano de la enfermedad.

Modelo de ratón experimental de GVHD:

Se recogieron muestras de sangre y bazo los días 0, 1, 3, 4, 5 y 6 después del trasplante, de los siguientes 3 grupos (al menos 3 ratones por grupo):

1. **Sin tratar:** Inyectados con medio simple (sin irradiación). Resultado esperado: ratones sanos.
2. **Singénico:** Ratones Balb/c inyectados con un trasplante de esplenocitos de ratones Balb/c donantes

compatibles después de la irradiación. Resultado esperado: Efectos a corto plazo de la irradiación y recuperación total, sin GVHD.

3. **Alogénico:** Ratones Balb/c inyectados con un trasplante de esplenocitos de ratones C57B1/6 de donantes no compatibles después de la irradiación. Resultado esperado: Efectos a corto plazo de la irradiación y posterior desarrollo de GVHD.

5

Resumen de resultados:

- Los niveles de p-GSK-3 β (GSK-3 β fosforilado en ser-9) y GSK-3 β total son mucho más bajos en ratones con GVHD que en ratones tanto singénicos y de control no tratados.
- El efecto mencionado anteriormente se ve a lo largo del tiempo el día 3-6 después del trasplante.

10

EJEMPLO 1

15 **Modelo de ratón de GVHD: Resultados en el bazo**

Ahora se hace referencia a la **Figura 4**, que muestra una representación gráfica de los niveles de expresión de la proteína de p-GSK-3 β (fosforilada en el sitio ser 9) (Figura 4A) y GSK-3 β total (Figura 4B) a lo largo del tiempo en muestras del bazo derivadas de ratones no tratados (control), singénicos y alogénicos.

20

Los resultados se han normalizado de tal manera que los valores para los ratones de control se establecieron como del 100%. Cada parámetro se comparó con los valores de ratones no tratados.

Como se muestra en la **Figura 4**, una disminución prolongada GSK-3 β total y p-GSK-3 β con el tiempo se detectó exclusivamente en el bazo de los ratones del grupo alogénico.

25

Se debe mencionar que en el grupo singénico, la población de esplenocitos no se ha recuperado lo suficiente para recoger células, hasta el día 5.

En el grupo alogénico, la proliferación de esplenocitos se detectó en los primeros días como resultado de la respuesta inmune característica de la GVHD.

30

Los días 5 y 6, una vez que aparecieron síntomas graves en los ratones, los niveles de GSK-3 β total y fosforilada en los ratones alogénicos se mantuvieron a un nivel inferior que los otros grupos, mientras que en los ratones singénicos, los niveles parece que se acercan casi a la normalidad.

35

Por lo tanto, los resultados obtenidos muestran que, en el grupo alogénico, p-GSK-3 β y GSK-3 β total disminuyen antes de la aparición de síntomas clínicos (los síntomas comienzan el día 4) y se mantienen más bajos que los grupos sin tratar y singénico en todo el transcurso de la enfermedad.

40

Ahora se hace referencia a la **Figura 5**, que muestra una representación gráfica de los niveles de expresión de la proteína de p-PKC (forma activa), a lo largo del tiempo en muestras del bazo derivadas de ratones no tratados (control), singénicos y alogénicos.

En el presente documento se reconoce que la PKC está localizada aguas arriba de GSK-3 β en varias rutas, y también es capaz de fosforilar GSK-3 β directamente.

45

Como se muestra en la **Figura 5**, los niveles de PKC activados son significativamente más bajos en los esplenocitos de ratones tanto singénicos como alogénicos, en relación con el control.

50

Se debe enfatizar que los resultados obtenidos se han normalizado de tal manera que los valores de los ratones de control se establecieron en el 100%. Cada parámetro se comparó con el valor de los ratones no tratados independientemente de otros parámetros.

55 Conclusiones para los resultados en el bazo:

- Las diferencias en la GSK-3 β total y la p-GSK-3 β en el bazo de los ratones alogénicos en comparación con los ratones singénicos, pueden detectarse tan pronto como el día 3, por lo que estas proteínas pueden utilizarse como marcadores para identificar y diagnosticar el inicio temprano de GVHD en ratones y

potencialmente en seres humanos.

- Basándose en los resultados anteriores, se puede usar un kit de diagnóstico que utiliza tecnología de chip de proteínas para controlar los cambios en los niveles de expresión de GSK-3 β y los cambios en el estado de activación de GSK-3 β en el bazo con el fin de predecir y detectar el inicio temprano de GVHD en seres humanos.

5

EJEMPLO 2

Modelo de ratón de GVHD: Resultados en sangre

10

Ahora se hace referencia a la **Figura 6**, que muestra una representación gráfica de los niveles de expresión de la proteína de p-GSK-3 β (fosforilada en el sitio ser 9) (**Figura 6A**) y GSK-3 β total (**Figura 6B**) a lo largo del tiempo en muestras de sangre derivadas de ratones no tratados (control), singénicos y alogénicos.

15 Como se muestra en la **Figura 6**, se observó una disminución prolongada de GSK-3 β total y p-GSK-3 β en la sangre a lo largo del tiempo solo en el grupo alogénico.

En el grupo singénico, aunque se observa una disminución en GSK-3 β total y p-GSK-3 β , aparece en una fase posterior a la de los ratones alogénicos.

20

En el grupo alogénico, hay una disminución en los niveles de GSK-3 β total y p-GSK-3 β a lo largo del tiempo, que es mayor que la disminución observada en el grupo singénico.

Se debe mencionar que los resultados se han normalizado de tal manera que los valores para los ratones de control se establecieron en el 100%. Cada parámetro se comparó con los valores de los ratones no tratados.

25

Conclusiones para los resultados en sangre:

- La disminución en GSK-3 β total y p-GSK-3 β en la sangre detectada en los ratones alogénicos fue mayor que en los ratones tanto de control como singénicos.

30

- La disminución es más sustancial los días 3 y 4, que se encuentran en el estadio temprano de la GVHD.

- Basándose en los resultados anteriores, se puede usar un kit de diagnóstico que utiliza tecnología de chip de proteínas para controlar los cambios en los niveles de expresión de GSK-3 β y los cambios en el estado de activación de GSK-3 β en la sangre con el fin de predecir y detectar el inicio temprano de GVHD en otros animales, incluyendo seres humanos.

35

- Las muestras de sangre indicativas de GVHD se obtuvieron de ratones, lo que demuestra la capacidad de recoger muestras de sangre útiles de otros mamíferos, incluidos los seres humanos.

- Sin desear quedar ligado a la teoría, en el presente documento se reconoce que los niveles en sangre detectados en ratones reflejan que la proliferación asociada a GVHD tuvo lugar en el bazo. Por lo tanto, se puede suponer que las células observadas en los ratones singénicos los días 3, 4 y quizás 5 son células que han existido en la periferia antes del trasplante. Esto contrasta con las células observadas en los ratones alogénicos el día 4, que son células nuevas que han emergido del bazo.

40

Los resultados anteriores demuestran por primera vez que GSK-3 β está directamente asociada con la progresión y la aparición del trastorno de GVHD.

45

EJEMPLO 3

Identificación molecular de la enfermedad GVHD

50

Un aspecto principal adicional de la presente invención es explorar la huella molecular única de la enfermedad GVHD. Tal huella molecular permite el establecimiento de un kit de diagnóstico como se divulga, entre otros, que comprende un conjunto de proteínas que están correlacionadas de forma única con GVHD. Para determinar la huella molecular para GVHD, las muestras de modelos de ratón se analizan mediante espectrometría de masas para identificar los siguientes datos:

55

- Las proteínas que están presentes en el sistema analizado
- Cambios en la expresión de proteínas
- Cambios en la fosforilación de proteínas

Basándose en el análisis de las muestras de ratón, se prepara un chip de proteína hecho a medida. El kit incluye moléculas candidatas identificadas como involucradas en GVHD, tales como los anticuerpos contra GSK-3 β , o proteínas involucradas en rutas relacionadas, marcadores de apoptosis, marcadores de proliferación, y otros (obtenidos mediante el uso de técnicas tales como el análisis por transferencia Western, FACS y datos de huellas moleculares). El kit mencionado anteriormente se usa para el pronóstico de la GVHD y su diagnóstico en estadios iniciales.

Los anticuerpos candidatos utilizados para el chip de proteína de GVHD incluyen anticuerpos que reconocen los siguientes biomarcadores:

- GSK-3 β total
- Fosforilación en ser 9 de GSK-3 β - indica la inactivación de GSK-3 β
- Activación de PKC - Indicación de inactivación de GSK-3 β
- b-catenina - inactivación de la GSK-3 β a través de la ruta Wnt activada
- Dvl - una proteína aguas arriba de GSK-3 β en la ruta Wnt, y un indicador de la activación de la ruta Wnt
- Akt - Proteína de cascada de señalización de PI-3K que fosforila GSK-3 β en ser9.
- Erk - Proteína de cascada de señalización de Map cinasa que fosforila directamente GSK-3 β en Ser9.
- P38 MAPK - Proteína de cascada de señalización de Map cinasa que fosforila directamente GSK-3 β en Ser389.
- Fosforilación en Tirosina 216 de GSK-3 β - Indica la activación de GSK-3 β
- Albúmina sérica - Se ha demostrado que está potencialmente vinculada a la aparición de GVHD
- Marcadores de apoptosis (Fas, familia Bcl, citocromo C, caspasas)
- Marcadores de la actividad inmune (Nf-kB, CD25)
- Marcadores de proliferación (Ciclina D1, PCNA, p27)

En realizaciones adicionales de la invención, los resultados del chip de proteína se validan adicionalmente realizando una comparación con los datos de transferencia Western para determinar la eficacia, la sensibilidad y la precisión del chip.

La información mencionada anteriormente se usa para evaluar las rutas que regulan GSK-3 β en GVHD y otras rutas implicadas en esta enfermedad.

Un aspecto principal de la invención es que los cambios observados en los niveles de expresión de GSK-3 β y el estado de activación se utilizan en el presente documento como marcadores novedosos para diagnosticar la GVHD. Controlando los cambios en los niveles de expresión de GSK-3 β y los cambios en el estado de activación de la proteína GSK-3 β , se puede detectar la aparición temprana de GVHD antes de los síntomas clínicos observables.

En otra realización preferida de la invención, el uso de GSK-3 β como marcador permite el diagnóstico de GVHD antes de la fase en la que los pacientes demuestran los síntomas observables y antes de la fase en la que el cuerpo del huésped es atacado por los linfocitos T.

En realizaciones adicionales de la invención, el análisis de transferencia Western de lisados de esplenocitos de ratón se realiza usando al menos una de las siguientes proteínas como marcadores potenciales para GVHD:

- b-catenina - Un marcador para la inactivación de la GSK-3 β a través de la ruta Wnt activada.
- Dvl - una proteína aguas arriba de GSK-3 β en la ruta Wnt, y un indicador de la activación de la ruta Wnt.
- Akt - Proteína de cascada de señalización de PI-3K que fosforila GSK-3 β en ser9.
- Erk - Proteína de cascada de señalización de Map cinasa que fosforila directamente GSK-3 β en Ser9.
- P38 MAPK - Proteína de cascada de señalización de Map cinasa que fosforila directamente GSK-3 β en Ser389.
- Fosforilación en tyr216 de GSK-3 β - Indica la activación de la GSK-3 β .

En realizaciones adicionales de la invención, el análisis por transferencia Western de lisados de sangre de ratón se realiza usando GSK-3 β , p-GSK-3 β , PKC, y al menos uno de los anticuerpos enumerados anteriormente como marcadores potenciales para GVHD.

En una realización adicional de la invención, se utilizan hígados de ratones modelo GVHD para realizar el análisis de GSK-3 β y proteínas relacionadas usando transferencia Western y/o técnicas de espectrometría de masas, o

cualquier otra técnica utilizada para el análisis de proteínas.

También está dentro del alcance de la presente invención que la regulación de la expresión de GSK-3 β se ensaye en un estudio de transcurso de tiempo de un modelo de ratón con GVHD aguda. Por lo tanto, mediante la manipulación de GSK-3 β se puede prevenir el inicio de la GVHD.

En una realización adicional de la invención, se identifican los sustratos de la GSK-3 β y los productos asociados con dichos sustratos.

10 En una realización adicional de la invención, se encuentran los sustratos y productos mencionados anteriormente que son específicos para el trastorno de GVHD. Estos sustratos y productos se utilizan para aumentar la sensibilidad de la tecnología de diagnóstico proporcionada por la presente invención.

En una realización adicional de la invención, se identifica la ruta específica que estimula el cambio específico en el estado de activación de la GSK-3 β asociada con el trastorno específico de interés tal como GVHD. Dichos candidatos que estimulan el estado de activación de la GSK-3 β pueden incluir:

- Dsh - Ruta Wnt (aguas arriba de GSK-3 β) asociada con la inactivación de la GSK-3 β a través de la ruta Wnt activada
- 20 - Akt - Ruta PI-3K/Akt asociada con la inactivación de Ser 9 de la ruta Wnt
- cAMP - Asociado con la inactivación de Ser 9 de la GSK-3 β

La información descrita anteriormente indica las rutas que regulan el estado de activación de la GSK-3 β en el trastorno específico de interés, tal como GVHD. Estos resultados se utilizan para la toma de huellas moleculares de una enfermedad específica asociada con el estado de activación de la GSK-3 β . Dichos datos de huellas moleculares se usan para aumentar la sensibilidad del kit de diagnóstico para la enfermedad de interés.

EJEMPLO 4

30 Estudio clínico usando el kit de diagnóstico de GVHD

E siguiente estudio clínico se realiza en asociación con un CRA (asociado de investigación clínica), incluida la aprobación de Helsinki y las negociaciones con los centros médicos:

- 35 - Se incluyen pacientes para el ensayo clínico (incluida la aprobación de Helsinki y las negociaciones con los centros médicos).
- Se recogen muestras de sangre de los pacientes que se han sometido a trasplantes de médula ósea (durante todo el año).
- El chip de proteína se utiliza para el análisis de las muestras humanas, para probar su eficacia en la predicción del inicio de GVHD aguda. Este es un estudio retrospectivo. Los resultados del análisis del kit se comparan con el resultado diagnóstico (según los estándares médicos actuales) para cada paciente.
- 40 - Si es necesario, el kit se calibra analizando muestras humanas utilizando el análisis por transferencia Western.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la enfermedad de injerto contra huésped, GVHD, en un mamífero que incluye un ser humano que comprende las etapas de;
 - 5 medir el nivel de GSK-3 β en una muestra obtenida de dicho mamífero, en el que una desviación significativa de los valores normales indica la presencia de GVHD.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además una etapa de medir el nivel de GSK-3 β midiendo al menos un parámetro seleccionado del grupo que consiste en: niveles de expresión de GSK-3 β ,
 - 10 niveles de activación de GSK-3 β , niveles de inactivación de GSK-3 β , expresión de GSK-3 β fosforilada en serina 9 y expresión de p-PKC.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además una etapa de medir el nivel de expresión y/o activación de GSK-3 β midiendo al menos un indicador de activación seleccionado del grupo que
 - 15 consiste en: sobreexpresión de GSK-3 β , fosforilación de tirosina 216 y cualquier combinación de las mismas.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además una etapa para determinar la expresión y/o el estado de inactivación de GSK-3 β midiendo al menos un indicador de inactivación seleccionado del grupo que consiste en: (i) fosforilación de serina 9; (ii) activación de Wnt determinada por al menos uno de: niveles
 - 20 de β -catenina o por un marcador de proteína específico para la inactivación de GSK-3 β a través de la ruta de Wnt activada, o por el sitio en la GSK-3 β al que la ruta activada de Wnt afecta estimulando la inactivación de la GSK-3 β ; (iii) niveles de expresión de PKC; (iv) un marcador de proteína específico para la inactivación de GSK-3 β a través de PKC activada, y cualquier combinación de los mismos.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una etapa adicional de toma de muestras del bazo, la sangre, otro fluido corporal o tejido.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que una de las siguientes afirmaciones es verdadera: (a) el método comprende además una etapa adicional para comparar el resultado de dichos niveles de
 - 30 GSK-3 β con un valor normal predeterminado obtenido de sujetos sanos, y (b) una desviación de al menos aproximadamente el 25% del valor de inactivación normal indica la presencia de GVHD.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende etapas adicionales de;
 - 35 a. medir el nivel de inactivación de GSK-3 β por un parámetro seleccionado del grupo que consiste en medir los niveles de β -catenina en ausencia de fosforilación de serina 9, en medir el sitio de estimulación en la GSK-3 β una vez estimulada a través de la ruta de Wnt activada, en medir un marcador de proteína que es único para la inactivación de GSK-3 β a través de la ruta de Wnt activada, y en medir un marcador de proteína que es único para la inactivación de GSK-3 β a través de la PKC activada; y
 - 40 b. comparar el resultado de dichos niveles de inactivación con un valor de inactivación normal predeterminado obtenido de sujetos sanos,

en el que una desviación de al menos aproximadamente el 25% de los valores normales de inactivación indica la presencia de GVHD.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de;
 - 45 a. medir los indicadores de inactivación de GSK-3 β ,
 - b. medir los indicadores de activación de GSK-3 β ,
 - 50 c. combinar las medidas de activación e inactivación de los indicadores,

en el que se obtiene una relación de activación con respecto a inactivación, característica de GVHD.

9. El uso de un kit en el diagnóstico de la enfermedad de injerto contra huésped, GVHD, comprendiendo
 - 55 dicho kit un chip de proteína que comprende un conjunto de anticuerpos unidos que reconocen biomarcadores característicos de GVHD, dichos biomarcadores se seleccionan del grupo que comprende GSK-3 β total, GSK-3 β fosforilada en serina 9, fosforilación en serina 9 de GSK-3 β , activación de PKC, fosforilación en tirosina 216 de GSK-3 β , para determinar los niveles de expresión de diferentes proteínas relevantes de GVHD en una muestra dada.

10. El uso de la reivindicación 9, en el que dichos biomarcadores son detectables antes de la aparición de síntomas de GVHD en un mamífero que incluye un ser humano.

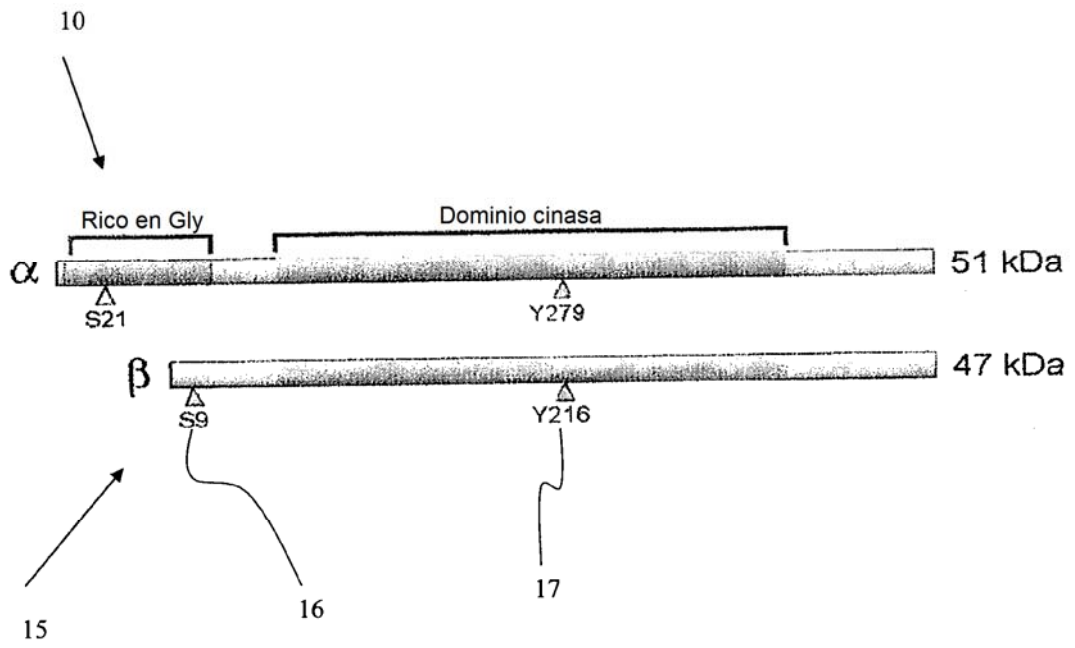


Fig. 1



Fig. 2

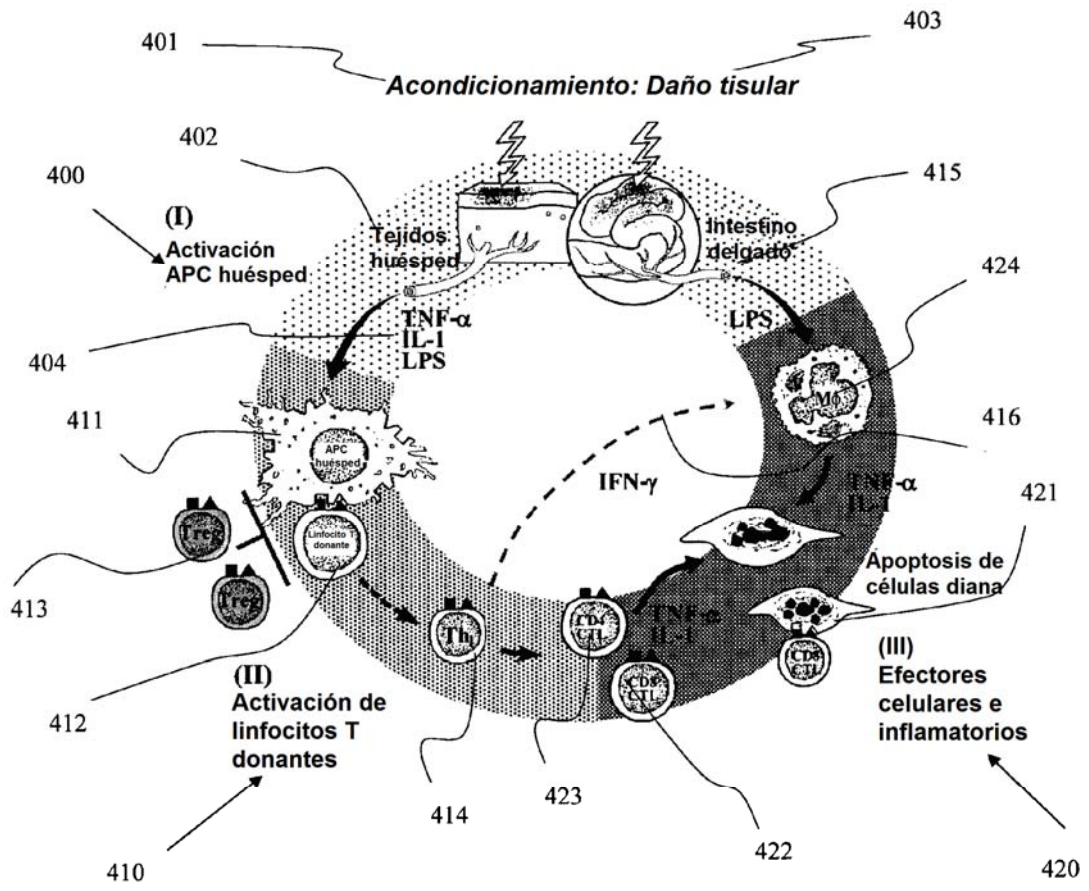


Fig. 3

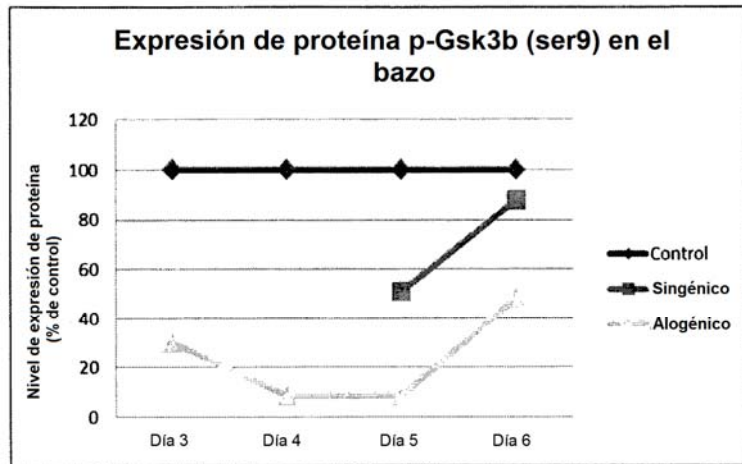


Fig. 4A

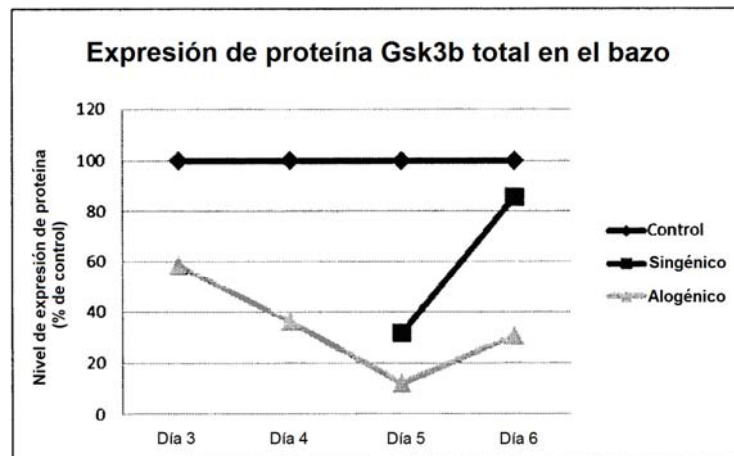


Fig. 4B

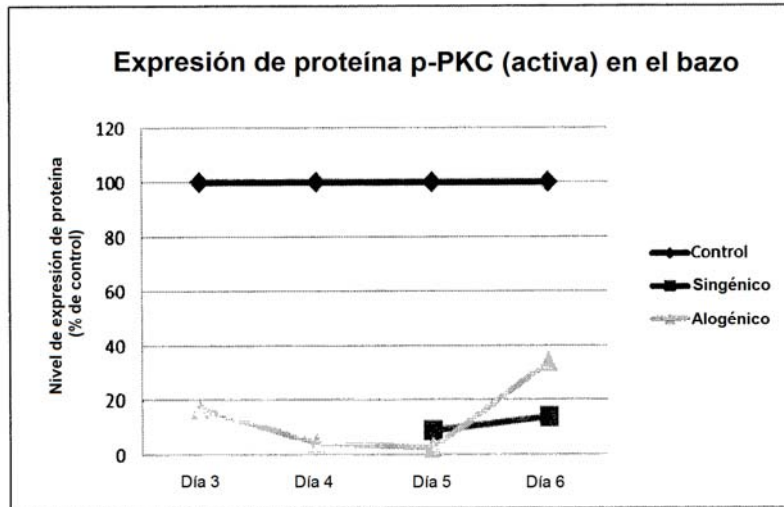


Fig. 5

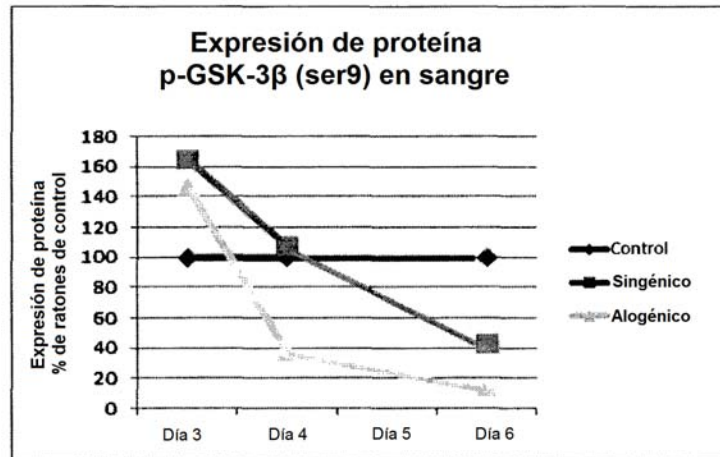


Fig. 6A

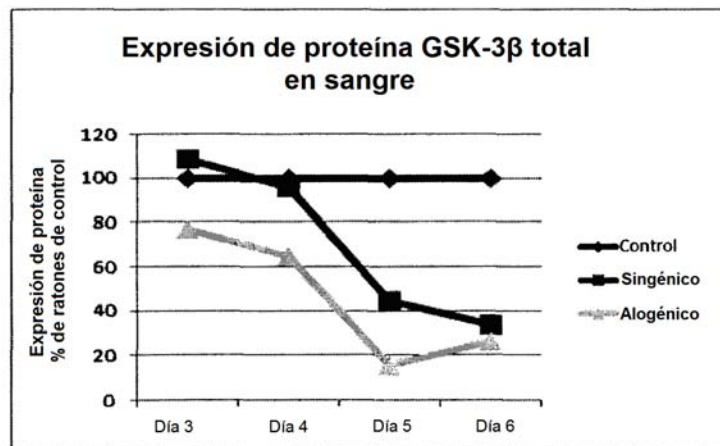


Fig. 6 B