

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 120**

51 Int. Cl.:

G01N 33/573 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2012 PCT/NL2012/050482**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13006059**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2012 E 12740236 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2729810**

54 Título: **Miositis**

30 Prioridad:

07.07.2011 US 201161505233 P
07.07.2011 NL 2007065

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.03.2019

73 Titular/es:

STICHTING KATHOLIEKE UNIVERSITEIT (50.0%)
Comeniuslaan 6
6525 HP Nijmegen, NL y
STICHTING KATHOLIEKE UNIVERSITEIT (50.0%)

72 Inventor/es:

PRUIJN, GERARDUS JOZEF MARIA;
PLUK, WILHELMINA LAMBERTA LEONARDA
PETRONELL y
VAN ENGELEN, BASILIUS GERARDUS MARIA

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 704 120 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

Miositis

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere al campo de la miopatía y, en particular, al diagnóstico de miositis por cuerpos de inclusión (MCI). En particular, la presente invención prevé el uso de 5'-nucleotidasa en el diagnóstico de una miopatía, en particular de MCI. También se proporcionan procedimientos para controlar la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento, procedimientos para distinguir entre diferentes subtipos de miopatías inflamatorias, así como kits para usar en el diagnóstico de una miopatía, en particular miositis por cuerpos de inclusión.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 **[0002]** La miopatía inflamatoria idiopática (MII), también llamada miositis, es un término genérico que designa las enfermedades autoinmunes del músculo (esquelético). Dermatomiositis (DM), Polimiositis (PM) y MCI son los subtipos principales de dichas miopatías inflamatorias idiopáticas (http://www.ninds.nih.gov/disorders/inflammatory_myopathies/detail_inflammatory_myopathies.htm; <http://myositis.org/template/page.cfm?id=2>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6196/>).

20 **[0003]** La DM es una enfermedad muscular caracterizada por una inflamación en el músculo y una erupción cutánea específica. La DM se presenta con mayor frecuencia en niños de 5 a 15 años y en adultos de 40 a 60 años. Las mujeres desarrollan la condición con más frecuencia que los hombres. Los síntomas típicos incluyen dificultad para tragar, debilidad muscular, rigidez o dolor, párpados superiores de color púrpura o violeta, erupción cutánea de color rojo púrpura y/o falta de aliento. La afectación de la disfunción cardíaca y pulmonar es posible, además, la DM se asocia con un riesgo elevado de desarrollar cáncer. La DM se trata con corticosteroides y otros medicamentos que suprimen el sistema inmunológico.

30 **[0004]** La PM es una condición similar, pero los síntomas pueden producirse sin una erupción cutánea específica. Ocurre más comúnmente entre los 50 y 70 años, o en niños de 5 a 15 años, siendo las mujeres dos veces más afectadas que los hombres. El tratamiento principal es, de nuevo, con medicamentos corticosteroides.

35 **[0005]** La MCI es el tercer subtipo principal del grupo de enfermedades musculares conocidas como miopatías inflamatorias. El nombre fue usado por primera vez por Yunis y Samaha en 1971 para un caso particular de miopatía que sugirió fenotípicamente la presencia de PM crónica, pero mostró vacuolas citoplasmáticas e inclusiones en la biopsia muscular.

40 **[0006]** El inicio de la debilidad muscular en la MCI es generalmente gradual (durante meses o años) y afecta tanto a los músculos proximales (cerca del tronco del cuerpo) como a los distales (más alejados del tronco). Para algunas personas, el trastorno comienza con debilidad en las muñecas y los dedos que causa dificultad para pellizcar, abotonar y agarrar objetos. También la dificultad para tragar ocurre en aproximadamente la mitad de los casos de la MCI. Con el tiempo, los pacientes pueden terminar en una silla de ruedas y en etapas posteriores de la enfermedad, la mayoría de los pacientes requieren asistencia importante para su vida diaria.

45 **[0007]** La MCI es la enfermedad muscular más comúnmente adquirida en personas mayores de 45 años, aunque la enfermedad puede ocurrir antes. La MCI se presenta con mayor frecuencia en hombres que en mujeres y se caracteriza por una combinación de degeneración muscular e inflamación (consulte Needham M, *Neuromuscul Disord.* 2008;18:6-16 y Amato AA, *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry.* 2009;80:1186-1193). En contraste con la DM y la PM, la MCI es generalmente resistente a todas las terapias y su tasa de progresión parece no verse afectada por los tratamientos actualmente disponibles.

[0008] El documento W02006115448 sugiere el uso de la hormona del crecimiento, un secretagogo de la misma o una mezcla de la misma, para curar la MCI o suprimir los síntomas asociados con la misma.

55 **[0009]** Se detectaron autoanticuerpos circulantes en la DM y la PM (véase las reseñas de Mammen AL (2010) *Ann N Y Acad Sci* 1184: 134-153 y Van Dooren y col. (2011) *Autoimmun Highlights* 2: 5-20). Estos anticuerpos, por ejemplo dirigidos contra las aminoacil-tRNA sintetasas, ocurren con diferentes prevalencias. Los autoanticuerpos específicos de la miositis (AEM) como anti-Jo-1 y anti-Mi-2 están asociados con fenotipos clínicos específicos en la PM y la DM, pero rara vez se encuentran en la MCI. Este conocimiento se utiliza en el diagnóstico de estas condiciones.

60 **[0010]** Actualmente, el diagnóstico de la MCI depende de un procedimiento de diagnóstico invasivo que incluye el examen de una biopsia muscular de un paciente o biopsias musculares repetidas para detectar la presencia de vacuolas con borde e inclusiones de proteínas. Debido al sesgo de selección, se pueden pasar por alto las vacuolas en el tejido muscular biopsiado, en cuyo caso se necesitan biopsias repetidas para establecer el diagnóstico.

65 Desafortunadamente, el diagnóstico erróneo debido a la interpretación errónea de las biopsias es un problema para

diferenciar la PM y la DM de la MCI. Por otra parte, una biopsia muscular es un procedimiento invasivo. Esto enfatiza la necesidad de procedimientos novedosos, más específicos y más amables para el paciente en el diagnóstico de la miopatía inflamatoria, en particular para diagnosticar la MCI, y distinguirla de la PM y/o la DM. Dirigirse al subtipo correcto en un sujeto humano evitará la aplicación innecesaria de terapias potencialmente tóxicas.

5

RESUMEN DE LA INVENCION

[0011] La invención se define en las reivindicaciones.

10 [0012] Los autores de la presente invención han identificado ahora el antígeno 5-nucleotidasa y sus fragmentos como una diana de autoanticuerpos en la MCI. Además, los autores de la presente invención han identificado zonas de 5'-nucleotidasa que pueden funcionar como dicha diana de autoanticuerpos y pueden comprender uno o más epítomos para el autoanticuerpo.

15 Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para identificar a un sujeto con riesgo de desarrollar miositis por cuerpos de inclusión y/o diagnosticar a un sujeto que padece miositis por cuerpos de inclusión, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a) proporcionar una muestra de prueba de dicho sujeto;
- b) determinar si los anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa están presentes en dicha muestra.

20

[0013] Tanto el nivel como la mera presencia pueden determinarse en los procedimientos según la invención. La presencia de dichos anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa y/o un fragmento de la misma es indicativo de un riesgo de desarrollar o tener la miopatía inflamatoria idiopática miositis por cuerpos de inclusión. Al mismo tiempo, la presencia de dichos anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa y/o un fragmento de la misma también es indicativa contra un riesgo de desarrollar o tener la miopatía inflamatoria idiopática dermatomiositis y/o polimiositis. Por lo tanto, la presente invención también proporciona un procedimiento para distinguir entre subtipos de miopatía inflamatoria idiopática.

25

[0014] En un segundo aspecto, la invención proporciona un procedimiento para controlar la progresión de la miositis por cuerpos de inclusión en un sujeto y/o para determinar la respuesta a la terapia dirigida a la miositis por cuerpos de inclusión en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

30

- a) proporcionar una primera muestra de prueba de dicho sujeto en un primer punto de tiempo, y una segunda muestra de prueba de dicho sujeto en un segundo punto de tiempo;
- b) determinar el nivel de anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa en dichas primera y segunda muestras;
- c) comparar el nivel de anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa en dicha primera muestra con dicha segunda muestra.

35

[0015] El procedimiento puede incluir (d) determinar la progresión de la miositis por cuerpos de inclusión en dicho sujeto y/o la respuesta a la terapia que trata la miositis por cuerpos de inclusión en base a la comparación del nivel de anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa, o fragmentos de los mismos entre dicha primera muestra y dicha segunda muestra. La progresión de la miositis por cuerpos de inclusión en dicho sujeto y/o la respuesta a la terapia dirigida a la miositis por cuerpos de inclusión se basa en la comparación del nivel de anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa y los fragmentos entre dicha primera muestra y dicha segunda muestra. El procedimiento según la invención es preferentemente un procedimiento en el que la 5'-nucleotidasa es NT5C1A (5'-nucleotidasa humana, citosólica IA) o NT5C1B (5'-nucleotidasa humana, citosólica IB), preferentemente NT5C1A, o un fragmento obtenido de la misma.

40

45

[0016] De forma alternativa, el procedimiento según la invención es preferentemente un procedimiento en el que la 5'-nucleotidasa comprende al menos 30, 40, 50, 100, 200, 300, preferentemente al menos 350, lo más preferentemente todos los aminoácidos adyacentes de la SEQ ID NO:1. y/o SEQ ID NO:2, o de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO:1 y/o la SEQ ID NO:2. Por ejemplo, ventajosamente la 5'-nucleotidasa puede comprender una o más de las zonas que pueden funcionar como una diana de autoanticuerpos y puede comprender uno o más epítomos para el autoanticuerpo expuesto en esta invención. Los ejemplos no limitativos de dichas zonas incluyen la zona de los aminoácidos 25-50, 221-243 y 341-368 de 5'-nucleotidasa IA.

50

55

[0017] En un aspecto preferido de la invención, se proporciona un procedimiento en el que la etapa real de determinar la presencia y/o nivel de anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa, se realiza determinando la interacción, unión, asociación entre dichos anticuerpos con la 5'-nucleotidasa y/o con un fragmento de dicha 5'-nucleotidasa, en el que dicho fragmento es un fragmento de al menos 7 aminoácidos adyacentes derivados de dicha 5'-nucleotidasa. La 5'-nucleotidasa, o el fragmento, puede ser de origen mamífero, ser sintético o ser producido por cualquier medio, siempre que sea capaz de reconocer (específicamente) y unirse con autoanticuerpos que pueden estar presentes en una muestra obtenida de un paciente con miositis por cuerpos de inclusión, dichos autoanticuerpos se unen a la 5'-nucleotidasa humana, preferentemente la proteína NT5C1A o NT5C1B. En general, la determinación de la presencia

60

65

de anticuerpos en una muestra, tal como se describe en esta invención, se realiza preferentemente ex vivo, cuando el sujeto es un ser humano o animal, in vitro o ex situ.

[0018] En una realización preferida, la 5'-nucleotidasa utilizada para determinar la interacción con el anticuerpo, o de la que se deriva el fragmento utilizado para determinar la interacción con el anticuerpo, es NT5C1A (5'-nucleotidasa humana, citosólica IA) o NT5C1B (5'-nucleotidasa humana, citosólica IB). En otra realización preferida, la 5'-nucleotidasa utilizada para determinar la interacción con el anticuerpo, o de la que se deriva el fragmento utilizado para determinar la interacción con el anticuerpo, comprende al menos 30, 40, 50, 100, 200, 300, preferentemente al menos 350, lo más preferentemente todos los aminoácidos adyacentes de la SEQ ID NO:1 y/o la SEQ ID NO:2, o de una secuencia de aminoácidos que tenga al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente, al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO:1 y/o la SEQ ID NO:2.

[0019] En una realización, la 5'-nucleotidasa utilizada para determinar la interacción con el anticuerpo engloba una o más de las zonas que pueden funcionar como una diana de autoanticuerpos y puede comprender uno o más epítomos para el autoanticuerpo expuesto en esta invención. Los ejemplos no limitativos de dichas zonas incluyen la zona de los aminoácidos 25-50, 221-243 y 341-368 de 5'-nucleotidasa IA.

[0020] La muestra de prueba utilizada en los procedimientos según la invención es preferentemente una muestra de sangre, muestra de sangre que, antes de determinar la presencia de autoanticuerpos contra la 5'-nucleotidasa, puede tratarse o purificarse adicionalmente. El sujeto es, preferentemente, un ser humano.

[0021] También se proporciona que los procedimientos de la presente invención comprenden además la etapa de determinar la presencia de anticuerpos contra al menos un antígeno seleccionado de entre el grupo que consiste en Mi-2, Ku, PM/ScI-100, PM/ScI-75, SRP, OJ, EJ, PL-12, PL-7, Ro-52, Jo-1, HisRS, ThrRS, AlaRS, GlyRS, IleRS, AsnRS, TyrRS, PheRS, ARN^{tHis}, ARN^{tAla}, Mi-2alpha, Mi-2beta, SRP54, SRP68, SRP72, Tif1-gamma, MDA5, SAE1, SAE2, serina-ARN^{tSec}-complejo proteico, Ro60, La, U1A, U1C, U1-70k, PMS1, PMS2, Ku70, Ku80, eEF1, RNP nuclear y NXP-2 en la muestra de prueba.

[0022] Los antígenos anteriores comprenden dianas de autoanticuerpos encontrados regularmente en pacientes con MII. Los últimos incluyen autoanticuerpos asociados a la miositis (MM), que no son específicos y también se encuentran en otros trastornos reumáticos, y autoanticuerpos específicos de la miositis (AEM), que se encuentran principalmente en pacientes con MII (véase Van Dooren y col. (2011) Autoimmun Highlights 2: 5-20). Al determinar la presencia o ausencia de anticuerpos contra estos antígenos adicionales y/o fragmentos de los mismos, se mejora aún más el diagnóstico de un sujeto.

[0023] En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de 5'-nucleotidasa y/o al uso de un fragmento de dicha 5'-nucleotidasa, en el que dicho fragmento es un fragmento de al menos 7, tal como 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos adyacentes derivados de dicha 5'-nucleotidasa, preferentemente de las zonas mencionadas anteriormente, para detectar anticuerpos presentes en una muestra de prueba obtenida de un sujeto. En una realización, la 5'-nucleotidasa, o el fragmento, puede ser de origen mamífero, ser sintética o producirse por cualquier medio, siempre que sea capaz de reconocer (específicamente) y unirse con autoanticuerpos que puedan estar presente en una muestra obtenida de un paciente con miositis por cuerpos de inclusión, que autoanticuerpos se unen a la 5'-nucleotidasa humana, preferentemente la proteína NT5C1A o NT5C1B. En general, la determinación de la presencia de anticuerpos en una muestra, tal como se describe en esta invención, se realiza preferentemente ex vivo, cuando el sujeto es un ser humano o animal, in vitro o ex situ. En otras palabras, los fragmentos de al menos 5, preferentemente al menos 6, más preferentemente al menos 7 aminoácidos adyacentes derivados de dicha 5'-nucleotidasa, son tales que pueden usarse para unirse o interactuar con los autoanticuerpos presentes en una muestra obtenida de un sujeto con miositis por cuerpos de inclusión, y que normalmente se uniría con la 5'-nucleotidasa, detectando así la presencia de dichos anticuerpos en una muestra y permitiendo el diagnóstico de miositis por cuerpos de inclusión.

[0024] La 5'-nucleotidasa, o el fragmento derivado de la misma, utilizada para determinar la interacción con un anticuerpo presente en una muestra es preferentemente NT5C1A (5'-nucleotidasa humana, citosólica 1A) o NT5C1B (5'-nucleotidasa humana, IB citosólica).

[0025] De forma alternativa, la 5'-nucleotidasa utilizada para detectar los anticuerpos, o de la cual se deriva el fragmento utilizado para determinar la interacción con el anticuerpo, comprende al menos 30, 40, 50, 100, 200, 300, preferentemente al menos 350, lo más preferentemente todos los aminoácidos adyacentes de la SEQ ID NO:1 y/o la SEQ ID NO:2, o de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO:2.

[0026] El uso según el aspecto anterior es particularmente útil para identificar un sujeto con riesgo de desarrollar miositis por cuerpos de inclusión y/o diagnosticar a un sujeto que sufre miositis por cuerpos de inclusión,

y/o controlar la progresión de la miositis por cuerpos de inclusión en un sujeto.

[0027] En una realización preferida, la muestra de prueba es una muestra de sangre. En una realización preferida, el sujeto es un humano.

5

[0028] En un aspecto final, la presente invención se refiere a un kit según la reivindicación 8. La solicitud proporciona un kit que comprende medios para detectar anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa presente en una muestra de prueba tomada de un sujeto, preferentemente en el que la 5'-nucleotidasa es NT5C1A (5'-nucleotidasa humana, citosólica IA) o NT5C1B (5'-nucleotidasa humana, citosólica IB) o la 5'-nucleotidasa que comprende al menos 30, 40, 100, 200, 300, preferentemente al menos 350, lo más preferentemente todos los aminoácidos adyacentes de la SEQ ID NO:1 y/o SEQ ID NO:2, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO:1 y/o la SEQ ID NO:2.

15 **[0029]** El kit según la invención es particularmente útil para identificar un sujeto con riesgo de desarrollar miositis por cuerpos de inclusión y/o diagnosticar a un sujeto que sufre miositis por cuerpos de inclusión, y/o controlar la progresión de la miositis por cuerpos de inclusión en un sujeto.

[0030] En una realización, el kit comprende 5'-nucleotidasa, preferentemente en el que la 5'-nucleotidasa es NT5C1A (5'-nucleotidasa humana, citosólica IA) o NT5C1B (5'-nucleotidasa humana, citosólica IB) o una 5'-nucleotidasa que comprende al menos 30, 40, 50, 100, 200, 300, preferentemente al menos 350, lo más preferentemente todos los aminoácidos adyacentes de la SEQ ID NO:1 y/o la SEQ ID NO:2, o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, más preferentemente al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO:2, o un fragmento de dicha 5'-nucleotidasa o dicha secuencia de aminoácidos, en el que dicho fragmento es un fragmento de al menos 5, preferentemente al menos 6, más preferentemente al menos 7 aminoácidos adyacentes derivados de dicha 5'-nucleotidasa o dicha secuencia de aminoácidos, como medio para detectar los anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa.

30 **[0031]** El kit según la invención es un kit en el que dicha 5'-nucleotidasa y/o fragmento para detectar anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa está fijado a una membrana adecuada para su uso en inmunoensayos in vitro, preferentemente una inmunotransferencia, perlas, perlas magnéticas, vehículos, ligadores de proteínas.

[0032] En una realización, el kit comprende además un ensayo para la detección de la unión de anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa, preferentemente el ensayo se selecciona del grupo que consiste en un ensayo de interacción molecular, ELISA, inmunotransferencia, microarreglos, inmunoprecipitación, inmunodifusión, contraínmunolectroforesis o técnicas de análisis multiplex.

[0033] El kit de la presente invención puede comprender ventajosamente además medios para detectar anticuerpos contra al menos un antígeno seleccionado de entre el grupo que consiste en Mi-2, Ku, PM/ScI-100, PM/ScI-75, SRP, OJ, EJ, PL-12, PL-7, Ro-52, Jo-1, HisRS, ThrRS, AlaRS, GlyRS, IleRS, AsnRS, TyrRS, PheRS, ARNtHis, ARNtAla, Mi-2alpha, Mi-2beta, SRP54, SRP68, SRP72, Tif1-gamma, MDA5, SAE1, SAE2, serina-ARNtSec-complejo proteico, Ro60, La, U1A, U1C, U1-70k, PMS1, PMS2, Ku70, Ku80, eEF1, RNP nuclear y NXP-2. Por ejemplo, el kit puede comprender estos antígenos, de fragmentos de los mismos, de la misma manera que se describe anteriormente para la 5'-nucleotidasa. La combinación de estos medios, por ejemplo, antígenos, o fragmentos de los mismos, en un kit junto con los medios descritos anteriormente para detectar la presencia de autoanticuerpos contra la 5'-nucleotidasa permite la detección de un panel de anticuerpos presentes en una muestra. En caso de que la muestra se derive de un sujeto, esto permite un mejor diagnóstico del sujeto y reduce significativamente el cambio de un diagnóstico erróneo o una interpretación errónea de los datos obtenidos.

50

DEFINICIONES GENERALES

[0034] En la siguiente descripción y ejemplos, se utilizan una serie de términos. Con el fin de proporcionar una comprensión clara y coherente de la especificación y las reivindicaciones, incluido el alcance que se le dará a dichos términos, se proporcionan las siguientes definiciones. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entienden comúnmente los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención.

[0035] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se utilizan en su sentido no limitativo para indicar que se incluyen los elementos que siguen a la palabra, pero no se excluyen los elementos que no se mencionan específicamente. El término también engloba "consistir esencialmente en" y "consistir en". Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un", "uno" o "una" no excluye la posibilidad de que más de uno de los elementos esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un", "uno" o "una" por lo general significa "al menos uno" o "al menos una". Se entiende además que, cuando se hace referencia a las "secuencias" en esta invención, generalmente se hace

65

referencia a las moléculas físicas reales con una cierta secuencia de subunidades (por ejemplo, aminoácidos).

- [0036]** El término "y/o" indica que puede ocurrir uno o más de los casos declarados. En otras palabras, un caso declarado puede ocurrir solo, o en combinación con, al menos uno de los casos declarados, hasta con todos los casos declarados. El término y/o describe que cada caso declarado tiene longitudes similares. En general, se utilizan los parámetros predeterminados de GAP, con una penalización de creación de hueco = 50 (nucleótidos)/ 8 (proteínas) y una penalización de extensión de hueco = 3 (nucleótidos)/2 solamente, así como la combinación específica de un caso declarado con al menos uno de los otros casos declarados, hasta con todos los casos declarados.
- 10 **[0037]** El término "anticuerpo" usado aquí se refiere a cualquier inmunoglobulina o fragmento de la misma, y engloba cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión a antígeno con al menos una zona determinante de complementariedad (CDR). El término incluye, pero no se limita a, anticuerpos policlonales, monoclonales, mono-específicos, poliespecíficos, no específicos, humanizados, quiméricos, humanos, monocatenarios, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados, injertados y generados in vitro. El término "anticuerpo" también incluye fragmentos de anticuerpos tales como Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, dAb y otros fragmentos de anticuerpos u otros constructos que comprenden CDR que retienen la función de unión a antígeno. Típicamente, dichos fragmentos comprenderían un dominio de unión a antígeno. Los detalles de la preparación de dichos anticuerpos y su idoneidad para su uso como miembros de unión, particularmente un miembro de unión específico, son bien conocidos por los expertos en la técnica.
- 15 **[0038]** El anticuerpo o fragmento del mismo puede ser cualquiera de los isotipos de anticuerpos conocidos y sus conformaciones, por ejemplo, IgA, tal como IgA1 o IgA2, IgD, IgE, IgG, tal como IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, o clase IgM, o puede constituir mezclas de los mismos en cualquier combinación, tal como una mezcla de anticuerpos de la clase IgG1 y IgG2a.
- 25 **[0039]** El término "sintético" designa material que no existe de manera natural, producido por ingeniería genética, síntesis, informatización, selección de bibliotecas, etc. in vitro, ex vivo o in vivo. El material sintético también incluye material artificial, que representa todo o parte del material natural, que comprende opcionalmente estructura(s) o fracción(es) modificada(s).
- 30 **[0040]** Gen significa cualquier molécula de ácido nucleico codificante. El término "gen" incluye no solo ADN genómico, sino también ADNc, ADN sintético, ARN, etc.
- [0041]** El término proteína se usa indistintamente con "polipéptido" y designa cualquier molécula que comprende un aminoácido o una cadena de aminoácidos, opcionalmente modificada, glicosilada, etc.
- 35 **[0042]** El término antígeno (o molécula antigénica) designa cualquier molécula tal como una proteína, polipéptido, péptido, lípido, ácido nucleico, polisacárido, epítipo, etc. contra el cual se busca u obtiene una respuesta inmune, o un ácido nucleico que lo codifica.
- 40 **[0043]** Un fragmento con el contexto de la presente invención es una parte de al menos 7 aminoácidos adyacentes (o un ácido nucleico que codifica estas secuencias de aminoácidos), derivados de, o presentes en, una proteína (adyacentes, uno junto al otro, en la misma secuencia), y que puede actuar como un antígeno, es decir, puede ser reconocido por un anticuerpo que también reconocería la proteína, que comprende, adyacentemente, los al menos 7 aminoácidos. Dicho fragmento puede comprender al menos parte de, pero preferentemente el epítipo, también conocido como determinante antigénico, es decir, la parte del antígeno proteico completo que es reconocido por el sistema inmune/paratopo del anticuerpo. Por ejemplo, en el caso de que un antígeno comprenda 100 aminoácidos, y los aminoácidos 50 - 58 formen el epítipo reconocido por el anticuerpo, un fragmento del antígeno es preferentemente un fragmento que comprende la secuencia de aminoácidos 50 - 58. El experto en la materia entenderá que el fragmento de aminoácido puede estar flanqueado en el extremo C y/o en el extremo N por otros compuestos, por ejemplo otros aminoácidos, incluso si dichos aminoácidos no flanquean el fragmento en el antígeno del que se obtiene el fragmento.
- 45 **[0044]** Una nucleotidasa es una enzima hidrolítica que cataliza la hidrólisis de un nucleótido en un nucleósido y un fosfato. Por ejemplo, convierten el monofosfato de adenosina en adenosina, y el monofosfato de guanósina en guanósina. Las nucleotidasas 5' escinden el fosfato del extremo 5' del resto de azúcar de los ácidos nucleicos. Se clasifican en diversos tipos en función de sus preferencias de sustrato y localización subcelular. Las nucleotidasas 5' unidas a membrana muestran especificidad hacia los monofosfatos de adenosina y están implicadas predominantemente en el rescate de nucleótidos preformados y en cascadas de transducción de señales que involucran receptores purinérgicos. Se sabe que todas las nucleotidasas 5' solubles pertenecen a la superfamilia de haloácido deshalogenasa de las enzimas. Un ejemplo es la NT5C1A, 5'-nucleotidasa, citosólica IA (HGNC: 17819), a veces también denominada 5'-NT"-AMP-específica, CN-1, CN-IA, CN1, CN1A, "5' nucleotidasa citosólica, tipo 1A", "5'-nucleotidasa citosólica IA", MGC119199 o MGC119201, que está codificada por el gen con ID de GenBank: AF331801.1, y es una proteína de 368 aminoácidos. Se expresa altamente en el músculo esquelético y se detecta en niveles intermedios en corazón, cerebro, riñón y páncreas. Perteneció a la familia tipo 3 de la 5'-nucleotidasa. Otro ejemplo es la NT5C1B, 5'-nucleotidasa, citosólica IB (HGNC:17818), a veces también denominada AIRP, la proteína
- 65

relacionada con la infertilidad autoinmune, la 5'-nucleotidasa citosólica IB o CN-IB, está codificada por el gen con ID de GenBank: AF356185.1, y es una proteína de 610 M. Se expresa altamente en testículos, placenta y páncreas. Se detecta a niveles más bajos en corazón, riñón, hígado y pulmón. Véase http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?match=NT5C1A

5 http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?match=NT5C1B para más información.

[0045] La "identidad de secuencia" y la "similitud de secuencia" pueden determinarse mediante la alineación de dos péptidos o dos secuencias de nucleótidos utilizando algoritmos de alineación globales o locales, en función de la longitud de las dos secuencias. Las secuencias de longitudes similares se alinean preferentemente usando un algoritmo de alineación global (por ejemplo, Needleman Wunsch) que alinea las secuencias de manera óptima en toda la longitud, mientras que las secuencias de longitudes sustancialmente diferentes se alinean preferentemente usando un algoritmo de alineación local (por ejemplo, Smith Waterman). Las secuencias pueden entonces denominarse "sustancialmente idénticas" o "esencialmente similares" cuando (cuando están alineadas de manera óptima, por ejemplo, con los programas GAP o BESTFIT que utilizan parámetros predeterminados) comparten al menos un cierto porcentaje mínimo de identidad de secuencia (como se define a continuación). GAP utiliza el algoritmo de alineación global de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias en toda su longitud (longitud total), maximizando el número de coincidencias y minimizando el número de huecos. Una alineación global se usa adecuadamente para determinar la identidad de secuencia cuando las dos secuencias (proteínas). Para los nucleótidos, la matriz de puntuación predeterminada utilizada es nwsgapdna y para las proteínas, la matriz de puntuación predeterminada es Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919). Los alineamientos de secuencia y las puntuaciones para el porcentaje de identidad de secuencia se pueden determinar utilizando programas informáticos, como el GCG Wisconsin Package, Versión 10.3, disponible en Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 EE. UU., o utilizando un software de código abierto, como el programa "aguja" (usando el algoritmo global de Needleman Wunsch) o "agua" (usando el algoritmo local de Smith Waterman) en Emboss WIN versión 2.10.0, usando los mismos parámetros que antes para GAP, o usando la configuración predeterminada (tanto para "aguja" como para "agua" y tanto para las proteínas como para los alineamientos de ADN, la penalización de apertura de hueco predeterminada es 10.0 y la penalización de extensión de hueco predeterminada es 0.5; las matrices de puntuación predeterminadas son Blossum62 para las proteínas y DNAFull para el ADN). Cuando las secuencias tienen una longitud total sustancialmente diferente, se prefieren las alineaciones locales, como el uso del algoritmo de Smith Waterman. De forma alternativa, el porcentaje de similitud o identidad se puede determinar mediante la búsqueda en bases de datos públicas, utilizando algoritmos como FASTA, BLAST, etc.

SECUENCIAS REFERIDAS A

35 **[0046]**

SEQ ID NO:1 Secuencia de aminoácidos de NT5C1A

SEQ ID NO:2 Secuencia de aminoácidos de NT5C1B

40 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0047] Los autores de la presente invención han identificado la 5'-nucleotidasa como una molécula diana de autoanticuerpos en la MCI. La MCI se caracteriza histopatológicamente por sus características tanto degenerativas como autoinmunes y los inventores han reconocido un antígeno del músculo esquelético de 44 kDa como una diana de autoanticuerpos en la MCI. La reactividad con el antígeno en la DM y la PM fue 0 % y 2 %, respectivamente. El antígeno se identificó como una 5'-nucleotidasa (véase más abajo) y se puede usar en la detección de anticuerpos que están presentes en muestras obtenidas de sujetos con MCI. Además, también se pueden usar los nuevos autoanticuerpos específicos de la MCI como biomarcadores para facilitar el diagnóstico de la MCI. Por ejemplo, la 5 'nucleotidasa purificada (recombinante) o los péptidos sintéticos derivados de esta proteína ahora se pueden usar 50 ventajosamente en ensayos de interacción biomolecular en una prueba de diagnóstico para la detección de anticuerpos anti-5'-nucleotidasa.

[0048] El documento W00204613 describe procedimientos para detectar 5'-nucleotidasas. Diazyme describe un kit para determinar la actividad de la "5'-nucleotidasa (5-NT)" en muestras de suero humano (Diazyme: "5'-Nucleotidase (5-NI)", 2008).

[0049] Actualmente, están disponibles comercialmente varias pruebas serológicas para la miositis, pero todas carecen de marcadores específicos de la MCI. Algunos ejemplos son el ensayo de inmunotransferencia para la miositis de Euroline y la prueba de Miositis plus desarrollada por Euroimmun (<http://www.euroimmun.com/>) y Orgentec (<http://www.orgentec.com/>), respectivamente. La implementación de 5'-nucleotidasa como un marcador específico de la MCI en estas pruebas permitiría el diagnóstico fácil y directo de la MCI. También se puede desarrollar y estandarizar fácilmente una prueba ELISA que usa 5'-nucleotidasa (o péptidos derivados de su secuencia).

[0050] Por lo tanto, en un primer aspecto se proporciona un procedimiento para identificar a un sujeto con riesgo de desarrollar una miopatía inflamatoria idiopática y/o diagnosticar a un sujeto que padece una miopatía

inflamatoria idiopática, preferentemente en el que dicha miopatía inflamatoria idiopática es una miositis por cuerpos de inclusión, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a) proporcionar una muestra de prueba de dicho sujeto;
- 5 b) determinar si los anticuerpos contra 5'-nucleotidasa están presentes en dicha muestra.

[0051] Actualmente, los inventores actuales han descubierto sorprendentemente que los sujetos que sufren, o están en riesgo de desarrollar, miositis por cuerpos de inclusión pueden ser diagnosticados por primera vez analizando la presencia de autoanticuerpos contra la 5'-nucleotidasa en una muestra obtenida de dicho sujeto. Al mismo tiempo, se ha encontrado que estos autoanticuerpos están virtualmente ausentes en muestras obtenidas de sujetos que padecen, o están en riesgo de desarrollar, otras miopatías inflamatorias idiopáticas como la dermatomiositis y/o la polimiositis. En otras palabras, la presente invención se puede usar tanto para evaluar el riesgo de desarrollar o tener una miopatía inflamatoria idiopática de miositis por cuerpos de inclusión, así como para evaluar el riesgo de desarrollar o tener otra miopatía inflamatoria idiopática como dermatomiositis y/o polimiositis.

[0052] En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para distinguir entre subtipos de MII, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de a) proporcionar una muestra de prueba de dicho sujeto; y b) determinar si los anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa están presentes en dicha muestra. La presencia de dichos anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa es indicativa de un riesgo de desarrollar o tener la miopatía inflamatoria idiopática de miositis por cuerpos de inclusión, y la presencia de dichos anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa es indicativa contra el riesgo de desarrollar o tener una miopatía inflamatoria idiopática como dermatomiositis y/o polimiositis. Es decir, cuando la muestra de prueba comprende anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa, un sujeto puede ser considerado en riesgo de desarrollar MCI o puede padecer MCI. Al mismo tiempo, descarta el sujeto que está en riesgo de desarrollar DM y/o PM o padecer DM y/o PM.

[0053] De forma alternativa, el nivel de anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa en una muestra de prueba puede compararse con una muestra de referencia, por ejemplo, de un sujeto sano no diagnosticado con una miopatía inflamatoria idiopática, por ejemplo, no diagnosticado con miositis por cuerpos de inclusión. Un aumento en el nivel de dicho anticuerpo en dicha muestra en comparación con el nivel de referencia puede ser indicativo de un riesgo de desarrollar o padecer miositis por cuerpos de inclusión. Una disminución, similar o idéntica en el nivel de dicho anticuerpo en dicha muestra en comparación con el nivel de referencia puede ser indicativo de un riesgo cero o bajo de desarrollar o padecer miositis por cuerpos de inclusión.

[0054] El procedimiento según la invención también puede utilizarse para la detección inmediata o temprana de una miopatía, preferentemente la miositis por cuerpos de inclusión.

[0055] Preferentemente, el(los) procedimiento(s) según la invención se llevan a cabo ex vivo, es decir, en una muestra de prueba ex vivo. Dicha muestra de prueba puede ser cualquier muestra obtenida de un sujeto, y no se limita a tejido o fluido obtenido de un sujeto. Una variedad de muestras puede ser útil en la práctica de la invención incluido, por ejemplo, sangre, suero, plasma, orina, fluido salival, fluido ascítico y similares. Preferentemente, la muestra de prueba es una muestra de sangre, ejemplos no limitativos de dicha muestra es una muestra de sangre completa, pero también se incluyen muestras de sangre tratadas posteriormente (por ejemplo, fraccionadas). El experto en la materia conoce bien las técnicas y los procedimientos para obtener una muestra de prueba de un sujeto.

[0056] En el contexto de la invención, un sujeto puede ser un animal o un ser humano. En principio, cualquier sujeto podría ser diagnosticado usando el procedimiento de la invención. El procedimiento de diagnóstico se puede aplicar tantas veces como sea necesario para ese sujeto. Preferentemente, el sujeto es un ser humano, preferentemente un ser humano de 40 años o más. En una realización adecuada, el sujeto es un sujeto que se sospecha que está en riesgo de desarrollar una miopatía inflamatoria idiopática y/o se sospecha que padece una miopatía inflamatoria idiopática, preferentemente en la que dicha miopatía inflamatoria idiopática es la miositis por cuerpos de inclusión. Se puede sospechar que un sujeto corre el riesgo de desarrollar una miopatía inflamatoria idiopática basada en la aparición de síntomas regularmente asociados con las miopatías inflamatorias idiopáticas, y como se ha descrito anteriormente.

[0057] La determinación de la presencia o nivel de anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa en una muestra de prueba puede realizarse mediante cualquier metodología adecuada disponible para el experto, por ejemplo, mediante un inmunoensayo, como ELISA, inmunoprecipitación o detección celular, o incluso usando anticuerpos (es decir, anticuerpos contra los anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa).

[0058] Utilizando las técnicas actuales de detección de anticuerpos que pueden cuantificar la unión de anticuerpos a antígenos de anticuerpos, se puede determinar el nivel o la cantidad de dichos anticuerpos en una muestra obtenida de un sujeto.

[0059] Los anticuerpos se pueden usar como reactivos analíticos específicos para cuantificar la cantidad de una proteína u otro antígeno. Esta técnica es el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA, por sus siglas

en inglés). En este procedimiento, una enzima, que reacciona con un sustrato incoloro para producir un producto coloreado, se une covalentemente a un anticuerpo específico que reconoce un antígeno diana. Si el antígeno está presente en una muestra, el complejo anticuerpo-enzima se unirá a él, y el componente enzimático del complejo anticuerpo-enzima catalizará la reacción que genera el producto coloreado. Por lo tanto, la presencia del producto coloreado indica la presencia del antígeno. Dicho ELISA, que es rápido y cómodo, puede detectar menos de un nanogramo (10^{-9} g) de una proteína. ELISA se puede realizar con anticuerpos policlonales o monoclonales, pero el uso de anticuerpos monoclonales produce resultados más fiables.

[0060] En el caso de detectar anticuerpos en una muestra, como en la presente invención, se puede usar un ELISA indirecto. El ELISA indirecto se utiliza para detectar la presencia de anticuerpos a través de antígenos que se absorben en un soporte sólido, por ejemplo, el fondo de un pocillo. Una muestra obtenida de un sujeto y que puede comprender anticuerpos contra el antígeno se añade al pocillo recubierto con antígeno y se deja que se una al antígeno. Finalmente, los anticuerpos ligados a enzimas contra anticuerpos humanos (por ejemplo, los anticuerpos de cabra que reconocen anticuerpos humanos) se dejan reaccionar en el pocillo y los anticuerpos no unidos se eliminan mediante lavado. Posteriormente, se aplica el sustrato. La conversión de sustrato indica que los anticuerpos ligados a enzimas se unieron a anticuerpos humanos, lo que a su vez implica que el paciente tenía anticuerpos contra el antígeno. Por lo tanto, en el caso de ELISA de fluorescencia, cuando se proyecta luz de la longitud de onda apropiada sobre la muestra, cualquier complejo de antígeno/anticuerpo producirá fluorescencia de modo que la cantidad de anticuerpo en la muestra pueda inferirse a través de la magnitud de la señal de fluorescencia.

[0061] Los sustratos pueden utilizar sustratos cromogénicos, aunque los sustratos fluorogénicos y los sustratos quimioluminiscentes se usan más comúnmente ya que permiten una mayor sensibilidad.

[0062] Otro procedimiento de detección de anticuerpos es la inmunoprecipitación (IP). Durante un experimento de IP, una muestra de prueba, por ejemplo, una muestra de sangre, se expone a un antígeno específico. Si el anticuerpo que se está probando está presente, se unirá al antígeno y todos los demás anticuerpos permanecerán sin unir. Si el anticuerpo específico no está presente, ninguno de los anticuerpos se unirá al antígeno. Después de dejar tiempo para la unión de anticuerpo-antígeno, todos los anticuerpos, junto con cualquier antígeno unido a los anticuerpos, se retiran de la muestra y se analizan.

[0063] La selección de células aprovecha las células que contienen antígenos específicos. La población de células seleccionadas se incuba con una muestra de prueba, por ejemplo, una muestra de suero de un paciente, y se permite que los anticuerpos de la muestra se unan a antígenos en las células seleccionadas. Posteriormente, los investigadores pueden detectar la unión de antígeno-anticuerpo analizando la presencia de anticuerpos en las células seleccionadas. Si los investigadores encuentran complejos anticuerpo-antígeno en las células seleccionadas, esto indica la presencia del anticuerpo dentro de la muestra del paciente.

[0064] De forma alternativa, la cantidad o presencia de los anticuerpos en la muestra de un sujeto puede determinarse utilizando cualquier otra técnica rutinaria conocida por el experto, incluidas entre otras, acción capilar, precipitación, turbidimétrica, difusión, aglutinación, potenciométrica, amperométrica, inmunosensores piezoeléctricos y de onda evanescente, o cualquier combinación de los procedimientos mencionados en esta invención.

[0065] También se proporciona un procedimiento para controlar la progresión de la miositis por cuerpos de inclusión en un sujeto y/o para determinar la respuesta a la terapia que trata la miositis por cuerpos de inclusión en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a) proporcionar una primera muestra de prueba de dicho sujeto en un primer punto de tiempo, y una segunda muestra de prueba de dicho sujeto en un segundo punto de tiempo;
- b) determinar el nivel de anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa en dichas primera y segunda muestras;
- c) comparar el nivel de anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa en dicha primera muestra con dicha segunda muestra.

[0066] También se proporciona dicho procedimiento en el que el procedimiento comprende d) determinar la progresión de la miositis por cuerpos de inclusión en dicho sujeto y/o la respuesta a la terapia que trata la miositis por cuerpos de inclusión basándose en la comparación del nivel de anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa entre dicha primera muestra. y dicha segunda muestra.

[0067] Preferentemente, el(los) procedimiento(s) según la invención se llevan a cabo ex vivo, es decir, en una muestra de prueba ex vivo. Dicha muestra de prueba puede ser cualquier muestra obtenida de un sujeto, y no se limita a tejido o fluido obtenido de un sujeto. Una variedad de muestras puede ser útil en la práctica de la invención incluido, por ejemplo, sangre, suero, plasma, orina, fluido salival, fluido ascítico y similares. Preferentemente, la muestra de prueba es una muestra de sangre, ejemplos no limitativos de dicha muestra es una muestra de sangre completa, pero también se incluyen muestras de sangre tratadas posteriormente (por ejemplo, fraccionadas).

[0068] Este procedimiento comprende las etapas de proporcionar una primera muestra de dicho sujeto en un primer punto de tiempo, una segunda muestra de dicho sujeto en un segundo punto de tiempo y determinar el nivel

de anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa en ambas muestras. Al comparar estas muestras, se puede determinar la progresión de la miositis por cuerpos de inclusión en dicho sujeto. Al medir el nivel de anticuerpos en una muestra de sujeto a lo largo del tiempo, un médico podrá determinar si la miositis por cuerpos de inclusión ha progresado y/o si, por ejemplo, el tratamiento fue satisfactorio o útil.

5

[0069] El término "terapia que trata la miositis por cuerpos de inclusión", como se usa en esta invención, se refiere a cualquier tratamiento de cualquier tipo que se espera mejore o revierta la miositis por cuerpos de inclusión en un sujeto. El sujeto puede ser un respondedor positivo, un respondedor pobre o un no respondedor. Para su uso en esta invención, un respondedor positivo es un sujeto que responde positivamente al tratamiento, es decir, un sujeto que experimenta éxito en la mejora de la miositis por cuerpos de inclusión. Un no respondedor es un sujeto que no responde al tratamiento o no responde a un nivel satisfactorio. Un respondedor pobre es un sujeto que responde al tratamiento pero no al nivel del respondedor positivo.

10

[0070] Un nivel similar o idéntico de anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa en dichas muestras primera y segunda puede ser indicativo de una respuesta moderada a la terapia o con la detención de la progresión de la miositis por cuerpos de inclusión. Si dicha segunda muestra se toma en un momento posterior a dicha primera muestra, un aumento del nivel de dichos anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa en dicha segunda muestra en comparación con el nivel de dicho biomarcador en dicha primera muestra puede ser indicativo de una respuesta negativa o baja a la terapia, o a la progresión de la miositis por cuerpos de inclusión (no respondedor). Si dicha segunda muestra se toma en un momento posterior a dicha primera muestra, una disminución del nivel de dicho anticuerpo contra la 5'-nucleotidasa en dicha segunda muestra en comparación con el nivel de dicho anticuerpo contra la 5'-nucleotidasa en dicha primera muestra puede ser indicativo de una respuesta positiva a la terapia (respondedor positivo).

15

20

[0071] En una realización preferida de los procedimientos, usos y kits de la invención, la 5'-nucleotidasa contra la que se dirigen los anticuerpos a detectar es NT5C1A (5'-nucleotidasa humana, citosólica IA) o NT5C1B (5'-nucleotidasa humana, citosólico IB), preferentemente NT5C1A. Una persona experta entenderá que los anticuerpos, como por ejemplo los presentes en una muestra de prueba obtenida de un sujeto que padece miositis por cuerpos de inclusión, pueden, además de reconocer la 5'-nucleotidasa, preferentemente la NT5C1A y/o NT5C1 B, reconocer ciertos fragmentos o partes de dichos antígenos.

25

30

[0072] De forma alternativa, en los procedimientos, usos y kits de la invención, la 5'-nucleotidasa contra la cual se detectan los anticuerpos comprende al menos 30, 40, 50, 100, 200, 300, preferentemente al menos 350, más preferentemente todos los aminoácidos adyacentes de la SEQ ID NO:1 y/o SEQ ID NO:2, o de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO:1 y/o SEQ ID NO:2. El experto en la materia entenderá que no es necesario para la presente invención que la 5'-nucleotidasa según la presente invención y a la que se dirigen los anticuerpos en un sujeto que padece miositis por cuerpos de inclusión tenga una secuencia de aminoácidos completamente idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 y o SEQ ID NO:2, sino que se permiten variaciones en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, isoformas u homólogos) sin desviarse de la invención. Del mismo modo, la presente invención incluye la realización de que solo fragmentos de la 5'-nucleotidasa como se ha descrito anteriormente, y contra los cuales se dirigen los anticuerpos en pacientes que padecen miositis por cuerpos de inclusión, por ejemplo, fragmentos de al menos 30, 40, 50, 100, 200, 300, preferentemente al menos 350 aminoácidos adyacentes, son suficientes para detectar una respuesta de anticuerpos en dichos pacientes.

35

40

45

[0073] En una realización, dichos fragmentos comprenden al menos una zona de aminoácidos de 5'-nucleotidasa IA seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- una zona de los aminoácidos 25 a 50 de la SEQ ID NO:1 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO:1;

50

- una zona de los aminoácidos 221 a 243 de la SEQ ID NO:1 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO:1; y

55

- una zona de los aminoácidos 341 a 368 de la SEQ ID NO:1 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO:1.

60

[0074] Se ha encontrado que estas zonas iban preferentemente dirigidas a los sueros de MCI. Estas zonas pueden representar zonas epítipo principales.

[0075] En una realización particularmente preferida de la presente invención, la etapa de determinar la presencia y/o nivel de anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa se realiza determinando la interacción entre dichos

65

anticuerpos y 5'-nucleotidasa y/o con un fragmento de dicha 5'-nucleotidasa, en el que dicho fragmento es un fragmento de al menos 5, preferentemente al menos 6, más preferentemente al menos 7 aminoácidos adyacentes derivados de dicha 5'-nucleotidasa. Preferentemente, la 5'-nucleotidasa utilizada para determinar la interacción con el anticuerpo, o de la que se deriva el fragmento utilizado para determinar la interacción con el anticuerpo, es NT5C1A (5'-nucleotidasa humana, citosólica IA) o NT5C1B (5'-nucleotidasa humana, citosólica IB). De forma alternativa, la 5'-nucleotidasa utilizada para determinar la interacción con el anticuerpo, o de la cual se deriva el fragmento utilizado para determinar la interacción con el anticuerpo, comprende al menos 30, 40, 50, 100, 200, 300, preferentemente al menos 350, lo más preferentemente todos los aminoácidos adyacentes de la SEQ ID NO:1 y/o la SEQ ID NO:2, o de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO:2.

[0076] En una realización, el fragmento comprende al menos 5, preferentemente al menos 6, más preferentemente al menos 7 aminoácidos adyacentes de una zona de 5'-nucleotidasa seleccionada de entre el grupo que consiste en: - una zona de aminoácido 25 a 50 de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO:1; - una zona de los aminoácidos 221 a 243 de la SEQ ID NO:1 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 1; y - una zona de los aminoácidos 341 a 368 de la SEQ ID NO:1 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO:1.

[0077] Como se ha descrito anteriormente, la detección de la presencia de anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa según la invención se puede realizar en cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia para detectar anticuerpos. Sin embargo, preferentemente, los anticuerpos en la muestra se detectan utilizando un antígeno u otro compuesto portador de epítipo específico para dichos anticuerpos. Así, en una realización, se puede utilizar una 5'-nucleotidasa, preferentemente NT5C1A y/o NT5C1B para detectar la presencia de anticuerpos, provocada contra la 5'-nucleotidasa del sujeto (por ejemplo, contra la NT5C1A del sujeto), presente en una muestra. En otra realización, un fragmento (es decir, un tramo de aminoácidos, adyacente presente en el polipéptido del cual se deriva u obtiene el fragmento) de dicha 5'-nucleotidasa, preferentemente NT5C1A y/o NT5C1B puede utilizarse para detectar la presencia de anticuerpos provocados contra la 5'-nucleotidasa del sujeto (por ejemplo, contra la NT5C1A del sujeto). Dicho fragmento puede ser principalmente de cualquier longitud siempre que comprenda el epítipo al que se dirige el anticuerpo en la muestra del sujeto. Preferentemente, el fragmento comprende al menos 5, 6 o 7 aminoácidos presentes de forma adyacente en la 5' nucleotidasa del sujeto (por ejemplo, en NT5C1A).

[0078] En una realización adecuada, el fragmento puede comprender al menos 5, preferentemente al menos 6, más preferentemente al menos 7, tales como 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más, aminoácidos adyacentes de una zona de 5'-nucleotidasa seleccionada de entre el grupo que consiste en: - una zona de los aminoácidos 25 a 50 de la SEQ ID NO:1 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos 98 %, lo más preferentemente al menos 99 % de identidad con la SEQ ID NO:1; - una zona de los aminoácidos 221 a 243 de la SEQ ID NO:1 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, más preferentemente al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 1; y - una zona de los aminoácidos 341 a 368 de la SEQ ID NO:1 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO:1.

[0079] Un experto en la materia sabe cómo puede obtener dicho fragmento útil para detectar anticuerpos en el procedimiento según la invención. Por ejemplo, puede producir fragmentos de diferente longitud y composición de, por ejemplo, NT5C1A y probarlos para determinar la unión (específica) con los anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa presente en una muestra obtenida de un sujeto que padece miositis por cuerpos de inclusión, y comparar la unión con las muestras obtenidas de, por ejemplo, sujetos sanos y/o sujetos que padecen otra miopatía inflamatoria idiopática, incluida la dermatomiositis y/o polimiositis. La ausencia de unión en muestras obtenidas de sujetos sanos y/o sujetos que padecen otra miopatía inflamatoria idiopática, incluida la dermatomiositis y/o polimiositis, y la presencia de unión en una muestra similar obtenida de una persona que padece miositis por cuerpos de inclusión, y dé positivo en la presencia de anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa del sujeto (por ejemplo, NT5C1A), es indicativa de un fragmento que puede usarse en el procedimiento según la invención para detectar dichos anticuerpos.

[0080] De forma alternativa, la 5'-nucleotidasa utilizada para determinar la interacción con el anticuerpo, o de la cual se deriva el fragmento utilizado para determinar la interacción con el anticuerpo, comprende al menos 30, 40, 50, 100, 200, 300, preferentemente al menos 350, lo más preferentemente todos los aminoácidos adyacentes de la SEQ ID NO:1 y/o la SEQ ID NO:2, o de una secuencia de aminoácidos que tenga al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO:1 y/o la SEQ ID NO:2. De hecho, como se ha explicado anteriormente, la

idoneidad de estas 5'-nucleotidasas, o secuencias de aminoácidos o fragmentos puede ser determinada fácil y directamente por el experto en la materia, sin una carga indebida. Los fragmentos de 5'-nucleotidasa adecuados incluyen aquellos que engloban una o más de las principales zonas de epítipo citadas anteriormente.

5 **[0081]** La 5'-nucleotidasa o un fragmento de la misma, utilizada en la detección, puede producirse sintéticamente, o por medios recombinantes o incluso aislarse del tejido. El experto en la materia entenderá que la 5'-nucleotidasa o un fragmento de la misma, utilizada en la detección de anticuerpos en una muestra obtenida de un sujeto, puede comprender además secuencias adicionales de aminoácidos, fracciones de marcadores, etiquetas y similares, y pueden estar, directa o indirectamente, unidas o fijadas a superficies, vehículos, perlas, perlas magnéticas, etc., siempre que esto no interfiera con la detección de los anticuerpos según la invención de una manera que haga que la detección sea poco fiable y/o impredecible.

10 **[0082]** Preferentemente, la muestra de prueba utilizada en todos los aspectos de la presente invención es una muestra de sangre. La muestra de sangre puede tratarse adicionalmente antes de su uso en los procedimientos, usos y kits de la invención.

15 **[0083]** En otra realización preferida, se proporciona un procedimiento según la invención que comprende además la etapa de determinar la presencia de anticuerpos contra al menos un antígeno seleccionado de entre el grupo que consiste en Mi-2, Ku, PM/Scl-100, PM/Scl-75, SRP, OJ, EJ, PL-12, PL-7, Ro-52, Jo-1, HisRS, ThrRS, AlaRS, GlyRS, IleRS, AsnRS, TyrRS, PheRS, ARNt^{His}, ARNt^{Ala}, Mi-2alpha, Mi-2beta, SRP54, SRP68, SRP72, Tif1-gamma, MDA5, SAE1, SAE2, serina-ARNt^{Sec}-complejo proteico, Ro60, La, U1A, U1C, U1-70k, PMS1, PMS2, Ku70, Ku80, eEF1, RNP nuclear y NXP-2 en la muestra de prueba.

20 **[0084]** Los antígenos anteriores son bien conocidos por los expertos en la técnica relacionados con enfermedades autoinmunes y específicamente miopatías inflamatorias idiopáticas. Los antígenos se describen en varias publicaciones científicas (véase, por ejemplo, Mammen AL (2010) Ann NY Acad Sci 1184:134-153 y Van Dooren y col. (2011) Autoimmun Highlights 2:5-20). Un inconveniente del diagnóstico actual es la prevalencia relativamente baja de anticuerpos contra estos antígenos en una enfermedad particular. Por ejemplo, aunque los anticuerpos contra Mi-2 son altamente específicos para la dermatomiositis, se pueden encontrar en el 15 a 30 % de los pacientes con dermatomiositis. Los anticuerpos contra Ku tienen una prevalencia de hasta el 10 % en el lupus eritematoso sistémico (LES), pero también se detectan en el 5 % al 25 % de los casos de síndrome de superposición de polimiositis/esclerodermia. Por lo tanto, la combinación de la detección de más de un anticuerpo en una muestra de prueba obtenida de un sujeto mejorará aún más el diagnóstico de la condición correcta y reducirá la posibilidad de diagnósticos erróneos, lo que a su vez reducirá el cambio de tratamiento y atención incorrectos.

30 **[0085]** Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de la 5'-nucleotidasa y/o el uso de un fragmento de dicha 5'-nucleotidasa, en el que dicho fragmento es un fragmento de al menos 5, preferentemente al menos 6, más preferentemente al menos 7 aminoácidos adyacentes derivados de dicha 5'-nucleotidasa para detectar anticuerpos presentes en una muestra de prueba obtenida de un sujeto. En una realización adecuada, el fragmento puede comprender al menos 5, preferentemente al menos 6, más preferentemente al menos 7, tales como 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más, aminoácidos adyacentes de una zona de 5' nucleotidasa seleccionada de entre el grupo que consiste en: - una zona de los aminoácidos 25 a 50 de la SEQ ID NO:1 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos 98 %, lo más preferentemente al menos 99 % de identidad con la SEQ ID NO:1; - una zona de los aminoácidos 221 a 243 de la SEQ ID NO:1 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, más preferentemente al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 1; y - una zona de los aminoácidos 341 a 368 de la SEQ ID NO:1 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO:1. En una realización, la 5'-nucleotidasa, o el fragmento derivado de ella, utilizado para determinar la interacción con el anticuerpo es NT5C1A (5'-nucleotidasa humana, citosólica IA) o NT5C1B (5'-nucleotidasa humana, citosólica IB). En otra realización o realización adicional, la 5'-nucleotidasa, utilizada para detectar los anticuerpos, o de la que se deriva el fragmento utilizado para determinar la interacción con el anticuerpo, comprende al menos 30, 40, 50, 100, 200, 300, preferentemente en al menos 350, lo más preferentemente todos los aminoácidos adyacentes de la SEQ ID NO:1 y/o la SEQ ID NO:2, o de una secuencia de aminoácidos que tenga al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO:1 y/o la SEQ ID NO:2. El uso según la invención está preferentemente en/para identificar a un sujeto con riesgo de desarrollar una miopatía inflamatoria idiopática y/o diagnosticar a un sujeto que padece una miopatía inflamatoria idiopática, en el que la miopatía inflamatoria idiopática se selecciona del grupo que consiste en miositis por cuerpos de inclusión, dermatomiositis y/o polimiositis, más preferentemente la miopatía inflamatoria idiopática es la miositis por cuerpos de inclusión y/o la supervisión de la progresión de la miositis por cuerpos de inclusión en un sujeto. La muestra de prueba en el uso según la invención es preferentemente una muestra de sangre, el sujeto es preferentemente un sujeto humano.

65 **[0086]** En un aspecto final de la invención, se proporciona un kit. El kit según la invención comprende medios

para detectar anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa presente en una muestra de prueba tomada de un sujeto, preferentemente en el que la 5'-nucleotidasa es NT5C1A (5'-nucleotidasa humana, citosólica IA) o NT5C1B (5'-nucleotidasa humana, citosólica IB) o la 5'-nucleotidasa que comprende al menos 30, 40, 50, 100, 200, 300, preferentemente al menos 350, lo más preferentemente todos los aminoácidos adyacentes de la SEQ ID NO:1 y/o
 5 SEQ ID NO:2, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO:1 y/o la SEQ ID NO:2. En una realización, la 5'-nucleotidasa puede comprender al menos 5, preferentemente al menos 6, más preferentemente al menos 7, tales como 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más, aminoácidos adyacentes de una zona seleccionada de entre el grupo que consiste en: - una zona de los aminoácidos 25 a 50 de la SEQ ID NO:1
 10 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos 98 %, lo más preferentemente al menos 99 % de identidad con la SEQ ID NO:1; - una zona de los aminoácidos 221 a 243 de la SEQ ID NO:1 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, más preferentemente al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 1; y - una zona de los aminoácidos 341 a 368 de la SEQ ID NO:1 o una secuencia
 15 de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO:1.

[0087] El kit según la invención es preferentemente para su uso en la identificación de un sujeto con riesgo de desarrollar una miopatía inflamatoria idiopática y/o diagnosticar a un sujeto que padece una miopatía inflamatoria
 20 idiopática, preferentemente en el que la miopatía inflamatoria idiopática se selecciona del grupo que consiste en miositis por cuerpos de inclusión, dermatomiositis y/o polimiositis, más preferentemente la miopatía inflamatoria idiopática es la miositis por cuerpos de inclusión y/o la supervisión de la progresión de la miositis por cuerpos de inclusión en un sujeto.

[0088] En una realización, el kit según la invención comprende 5'-nucleotidasa, preferentemente en el que la 5'-nucleotidasa es NT5C1A (5'-nucleotidasa humana, citosólica IA) o NT5C1B (5'-nucleotidasa humana, citosólica IB) o una 5'-nucleotidasa que comprende al menos 30, 40, 50, 100, 200, 300, preferentemente al menos 350, lo más preferentemente todos los aminoácidos adyacentes de la SEQ ID NO:1 y/o la SEQ ID NO:2, o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos el 90 % , más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al
 30 menos el 98 %, más preferentemente al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO:2, o un fragmento de dicha 5'-nucleotidasa o dicha secuencia de aminoácidos, en el que dicho fragmento es un fragmento de al menos 5, preferentemente al menos 6, más preferentemente al menos 7 aminoácidos adyacentes derivados de dicha 5'-nucleotidasa, como medio para detectar los anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa. En una realización adecuada, el fragmento puede comprender al menos 5, preferentemente al menos 6, más preferentemente al menos
 35 7, tales como 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más, aminoácidos adyacentes de una zona de 5'-nucleotidasa seleccionada de entre el grupo que consiste en: - una zona de los aminoácidos 25 a 50 de la SEQ ID NO:1 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos 98 %, lo más preferentemente al menos 99 % de identidad con la SEQ ID NO:1; - una zona de los aminoácidos 221 a 243 de la SEQ ID NO:1 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos el 90 %, más preferentemente al
 40 menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, más preferentemente al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 1; y - una zona de los aminoácidos 341 a 368 de la SEQ ID NO:1 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 1. Los detalles con respecto a secuencias adecuadas, fragmentos y similares ya se han descrito anteriormente, y están dentro del conocimiento de un experto
 45 en la materia. Dicho fragmento de 5'-nucleotidasa puede comprender opcionalmente como máximo 367, tal como 365, 360, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9 u 8 aminoácidos.

[0089] El kit según la invención puede ser un kit en el que dicha 5'-nucleotidasa y/o fragmento para detectar
 50 anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa está fijada a un medio, preferentemente seleccionado de entre el grupo que consiste en una membrana adecuada para su uso in vitro. inmunoensayos, preferentemente una inmunotransferencia, perlas, perlas magnéticas, vehículos, ligadores de proteínas, superficies. La colocación del antígeno o epítipo es conocida por el experto en la materia.

[0090] El kit puede comprender además un ensayo para la detección de la unión de anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa, preferentemente el ensayo se selecciona del grupo que consiste en un ensayo de interacción molecular, ELISA, inmunotransferencia, microarreglos, inmunoprecipitación, inmunodifusión, contraimmunoelectroforesis, ensayo de transferencia de línea o técnicas de análisis con multiplexación. En el contexto de la presente invención, "comprender un ensayo" puede indicar que el kit comprende todos los medios necesarios para realizar un protocolo
 60 particular, que el kit comprende instrucciones escritas para realizar un protocolo particular y/o que comprende solo parte de los medios necesarios para realizar un protocolo particular, pero, por ejemplo, no comprende el aparato necesario de materiales específicos (incluidas las muestras de prueba). Las técnicas anteriores son conocidas por el experto en la materia y se han revisado, por ejemplo, en Van Dooren y col. (2011) Autoimmun Highlights 2: 5-20.

[0091] Van Dooren describe que se han desarrollado un número de ensayos basados en multiplexación a lo

largo de los años, con distintas diferencias metodológicas. Los ensayos multiplex pueden seleccionar una muestra única de sangre u otro líquido biológico con una serie de especificidades de autoanticuerpos simultáneamente. De esta manera se puede hacer un perfil de los autoanticuerpos específicos del paciente. Un tipo de ensayo basado en multiplex son los microarreglos de autoantígenos basados en superficies sólidas que contienen proteínas
 5 inmovilizadas u otras biomoléculas en posiciones predeterminadas sobre una superficie sólida. Las interacciones entre los antígenos inmovilizados y las moléculas en la muestra de suero como los anticuerpos (marcados) se pueden detectar mediante procedimientos basados en la fluorescencia. Un segundo tipo es el denominado microarreglo de autoantígenos con perlas direccionables. Los antígenos individuales de interés se acoplan químicamente a perlas de diferentes colores. Posteriormente, los sueros u otros fluidos biológicos se pueden analizar en un pocillo de
 10 microtitulación que contiene una mezcla de perlas. Un láser medirá el color de la perla acoplada con el antígeno específico, mientras que un segundo láser determina la presencia y la cantidad de un anticuerpo secundario acoplado a un fluorocromo unido a la perla. Los ensayos basados en multiplex como las técnicas de microarreglos de autoantígeno descritas tienen ventajas sobre las técnicas convencionales en términos de volúmenes de muestra reducidos, sensibilidad mejorada, automatización y mayor número de muestras que se pueden analizar.

15 **[0092]** Los ensayos de transferencia de línea, o los llamados inmunoensayos de línea (LIA), se basan en procedimientos de inmunotransferencia que detectan antígenos purificados en membranas de unión a proteínas sin la necesidad de electroforesis en gel. El laborioso procedimiento de purificación de antígenos nativos está siendo reemplazando por la producción más reproducible de antígenos recombinantes altamente purificados o péptidos
 20 sintéticos. Estos desarrollos contribuyen al aumento de la sensibilidad y la especificidad de las transferencias de líneas disponibles comercialmente. Recientemente se han validado clínicamente diversos LIA de diferentes fabricantes y los resultados muestran que los LIA se están convirtiendo en una alternativa adecuada a las técnicas más costosas y complejas que a veces se usan en los laboratorios de diagnóstico.

25 **[0093]** En otra realización adicional, el kit comprende al menos un antígeno seleccionado de entre el grupo que consiste en Mi-2, Ku, PM/ScI-100, PM/ScI-75, SRP, OJ, EJ, PL-12, PL-7, Ro-52, Jo-1, HisRS, ThrRS, AlaRS, GlyRS, IleRS, AsnRS, TyrRS, PheRS, ARNtHis, ARNtAla, Mi-2alpha, Mi-2beta, SRP54, SRP68, SRP72, Tif1-gamma, MDA5, SAE1, SAE2, serina-ARNtSec-complejo proteico, Ro60, La, U1A, U1C, U1-70k, PMS1, PMS2, Ku70, Ku80, eEF1, RNP nuclear y NXP-2, por el motivo ya analizado anteriormente. El experto en la materia entenderá que dicho antígeno
 30 también puede ser un fragmento, como se ha analizado anteriormente para la 5'-nucleotidasa, derivada u obtenida de la proteína contra la que se provocó el anticuerpo a detectar, por ejemplo, en el sujeto del cual se obtiene la muestra. Un antígeno para su uso en el kit según la invención es cualquier (fragmento de) una proteína que puede usarse para detectar con un cierto nivel de especificidad un anticuerpo dirigido contra dicha proteína.

35 **[0094]** Quedará claro que la descripción anterior se incluye para ilustrar algunas realizaciones de la invención, y no para limitar el alcance de la protección.

[0095] El experto en la materia entenderá que todas las realizaciones y preferencias descritas en esta invención pueden combinarse en realizaciones adicionales de la presente invención. El experto en la materia entenderá
 40 igualmente que ciertos elementos o características técnicas de una primera realización, aspecto o preferencia pueden combinarse con ciertos elementos o características técnicas de una segunda realización, aspecto o preferencia, sin abandonar el alcance de la descripción y la invención. Por ejemplo, en el caso en que se hace referencia en una primera realización a la 5'-nucleotidasa en un procedimiento para detectar la progresión de la miositis por cuerpos de inclusión, y en una segunda realización la 5'-nucleotidasa es, preferentemente, NT5C1A, se describe el uso de
 45 NT5C1A en un procedimiento para detectar la progresión de la miositis por cuerpos de inclusión.

[0096] Los siguientes ejemplos no limitativos ilustran realizaciones diferentes de la invención. A menos que se indique lo contrario en los Ejemplos, todas las técnicas de ADN recombinante se llevan a cabo según los protocolos estándar descritos en Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring
 50 Harbor Laboratory Press, y Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; o volúmenes 1 y 2 de Ausubel y col. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols*, USA. Materiales estándar.

EJEMPLOS

55 Ejemplo 1: Un biomarcador para la miositis por cuerpos de inclusión: anti-Mup44, un autoanticuerpo específico de la MCI

[0097] A continuación se describe la identificación de un antígeno del músculo esquelético de 44 kDa (Mup44) como una diana de autoanticuerpos en la MCI. El Mup44 fue reconocido por el 27 % de los sueros de pacientes de
 60 MCI. La reactividad con Mup44 en dermatomiositis y polimiositis fue de 0 % y 2 %, respectivamente. Estos nuevos autoanticuerpos específicos de la MCI y el antígeno se pueden utilizar como biomarcadores para facilitar el diagnóstico de la MCI. Los autoanticuerpos contra este antígeno parecen ser altamente específicos para la MCI, lo que demuestra que es un biomarcador novedoso para la MCI.

65

PROCEDIMIENTOS

Muestras de suero

5 **[0098]** Muestras de suero de un grupo de pacientes con miopatía inflamatoria bien caracterizados descritos por Abdo y col. (Abdo WF, Acta neuropathologica. 2009;118:429-431). (31 MCI, 47 PM y 24 pacientes con DM) se utilizaron en este estudio. Para confirmar, se analizó una cohorte separada de muestras de suero de pacientes con MCI (Badrising UA, Annals of neurology. 2002;51 :369-372), así como suero de individuos sanos obtenidos de la Sanquin Blood Supply Foundation (Nijmegen, Países Bajos).

10

Extracto muscular y lisados de células

[0099] El músculo humano sano de los isquiotibiales obtenido de la cirugía reconstructiva se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C. Las piezas pequeñas del tejido muscular congelado se pulverizaron con un microdisembrador (Braun Biotech International, Melsungen, Alemania), se resuspendieron en 10 volúmenes de tampón RIPA (Tris-Cl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, 1 % NP-40, 0,5 % DOC, 0,1 % SDS, DTT 10 mM, PMSF 0,5 mM y cóctel inhibidor de proteasa (Roche, Mannheim, Alemania)), sonicados a 4 °C y centrifugados durante 15 minutos a 21.000 g. El sobrenadante se usó para la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) seguido de un análisis de transferencia Western.

20

[0100] Se cultivaron células de mioblasto C2C12 de ratón y linfocito Jurkat humano según procedimientos estándar y se lisaron por sonicación en tampón de lisis (50 mM Hepes-KOH, pH 7,4, KCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, 0,05 % NP-40, 0,5 mM PMSF y cóctel inhibidor de proteasa) seguido de una centrifugación a 21.000 g.

25 Análisis de transferencia Western

[0101] Los extractos de músculo humano, Jurkat o lisados de células C2C12 se separaron mediante SDS-PAGE al 12 % utilizando toda la anchura de los geles y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se cortaron en tiras de 3-4 mm de ancho, se bloquearon con leche en polvo al 5 % en PBS-Tween-20 al 0,1 % (PBS-T) y se incubaron con suero de paciente humano, se diluyeron 1:1000 en leche con 5 % de PBST. Los anticuerpos unidos se visualizaron utilizando anticuerpos secundarios marcados con IRDye800 de cabra antihumano (Rockland, Gilbertsville, EE. UU.) y se escanearon con el sistema Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, EE. UU.).

RESULTADOS

35

Identificación de Mup44 en extracto de músculo esquelético humano

[0102] Para identificar las dianas de autoanticuerpos en el tejido muscular esquelético, los extractos sanos de los isquiotibiales humanos se separaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a nitrocelulosa y se incubaron con sueros de pacientes con MCI. Varios polipéptidos fueron reconocidos por los anticuerpos en estos sueros de pacientes. Aunque los diferentes sueros fueron reactivos con distintos antígenos musculares, parece que un polipéptido prominente fue detectado comúnmente por varios sueros MCI. Cuatro de los 9 sueros MCI fueron reactivos con este polipéptido con un peso molecular de aproximadamente 44 kDa.

45 **[0103]** Curiosamente, a diferencia de otros antígenos detectados, el polipéptido de 44 kDa era específico del músculo esquelético. No se pudo detectar en extractos de líneas celulares cultivadas como las células Jurkat y HeLa humanas ni en los miotubos C2C12 de ratón diferenciados. Sin embargo, sí que se detectó en extractos de músculo esquelético de ratón así como en muestras de músculo esquelético sano y afectado por MCI. La inmunotransferencia mediante tiras de transferencia adyacentes confirmó que el antígeno de 44 kDa detectado por los diferentes sueros de pacientes de MCI mostró exactamente la misma movilidad electroforética en los geles de SDS-PAGE, mostrando una proteína antigénica común, en lo sucesivo denominada Mup44 (Proteína muscular de 44 kDa), es reconocida por estos sueros.

Asociación de autoanticuerpos anti-Mup44 con MCI en sueros de miositis

55

[0104] Para investigar si los anticuerpos anti-Mup44 son específicos para sueros de MCI o también se encuentran en sueros de pacientes con otras miopatías inflamatorias, se analizaron sueros de 24 pacientes con DM y 47 pacientes con MP mediante inmunotransferencia como se ha descrito anteriormente. Como se muestra en la Tabla 1, el 29 % de los sueros de MCI en esta cohorte contienen autoanticuerpos contra la Mup44. Aunque los sueros DM y PM fueron reactivos con varias proteínas antigénicas en extractos musculares (no se muestran los datos), ninguno de los DM y solo un suero PM mostró reactividad con la Mup44 (Tabla 1).

[0105] La frecuencia relativamente alta de autoanticuerpos dirigidos a la Mup44 en los sueros de MCI se confirmó en una cohorte independiente de sueros de MCI, en la que el 25 % de los sueros eran reactivos con Mup44. Ninguno de los 32 sueros de individuos sanos contenía autoanticuerpos anti-Mup44 (Tabla 1). En total, se detectó

65

anti-Mup44 con una sensibilidad del 27 % y una especificidad del 99 % en los sueros de pacientes de MCI.

Tabla 1. Prevalencia de autoanticuerpos anti-Mup44.

	Número de sueros analizados	Número de sueros que reconocen Mup44	% de sueros que reconocen Mup44
MCI ^a	31	9	29
DM ^a	24	0	0
PM ^a	47	1	2
MCI ^b	32	8	25
NHS ^c	32	0	0

5 ^aCohorte de suero de miositis (Abdo WF, Acta neuropathologica. 2009; 118: 429-431);

^bCohorte de suero 2 de MCI (Badrising UA, Annals of neurology. 2002;51:369-372)

^cSueros de individuos sanos.

ANÁLISIS

10

[0106] Un autoantígeno muscular de 44 kDa, denominado Mup44, que fue reconocido por el 27 % de los sueros de MCI analizados, mientras que fue difícilmente reactivo o no reactivo con otros sueros de control de miositis y sanos. Se detectaron autoanticuerpos anti-Mup44 con una especificidad del 99 %. La frecuencia de reactividad anti-Mup44 en los sueros de MCI es relativamente alta en comparación con otras reactividades de autoanticuerpos en la miositis.

15 Es similar a la del AEM anti-Jo-1 detectado con mayor frecuencia, que va dirigido al 20 %-30 % de los pacientes con MP y DM. Ha sido una práctica común utilizar líneas celulares cultivadas como las células HeLa para la identificación de autoantígenos en enfermedades autoinmunes. Como resultado de la aparente ausencia de expresión de Mup44 en dichas líneas celulares, los anticuerpos del paciente contra esta proteína han escapado a la detección hasta el momento. Por lo tanto, anti-Mup44 representa un biomarcador de MCI basado en anticuerpos que puede distinguir la MCI de otras miopatías inflamatorias. Esto es particularmente relevante en vista de la dificultad para diferenciar la PM y la MCI en base al análisis histológico de las biopsias musculares. Concluimos que la presencia de autoanticuerpos anti-Mup44 es un biomarcador novedoso para la MCI.

20

Ejemplo 2: Identificación de Mup44 como 5'-nucleotidasa IA

25

[0107] Para revelar la identidad molecular de Mup44, la proteína se aisló de extractos de músculo esquelético saludables mediante cromatografía de inmunoafinidad utilizando anticuerpos aislados de sueros de pacientes de MCI. La SDS-PAGE y la tinción de las proteínas aisladas revelaron un polipéptido del peso molecular esperado solo en el material obtenido con anticuerpos de pacientes con MCI y no con anticuerpos de los controles. La identidad de este polipéptido se ha determinado mediante análisis espectrométrico de masas (MS) de péptidos tripticos obtenidos mediante digestión en gel.

30

PROCEDIMIENTOS

35 **[0108]** Se aisló IgG a partir de muestras de suero de 250 µl de 2 pacientes con MCI y de un conjunto de sueros humanos sanos mediante incubación con perlas de 250 µl de la proteína A-agarosa (suspensión al 50 %; Kem-en-Tec, Dinamarca). Posteriormente, la IgG se acopló covalentemente a las perlas de proteína A mediante el bifuncional reticulante dimetil dihidrocloruro de pimelinediimidato (Sigma Aldrich) en un tampón de borato de sodio 0,2 M, pH 9,0. Las perlas acopladas con anticuerpos se lavaron con etanolamina y PBS y se almacenaron a 4 °C hasta su uso posterior.

40

[0109] El músculo humano sano de los isquiotibiales obtenido de la cirugía reconstructiva se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C. Se pulverizaron pequeños trozos de tejido muscular congelado con un microdismembrador (Braun Biotech International, Melsungen, Alemania). El material resultante se resuspendió en 10 volúmenes de tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 al 1 % (NP-40), desoxicolato de sodio al 0,5 %, SDS al 0,1 %, ditiotretitol 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,5 mM y cóctel inhibidor de la proteasa completa (Roche, Mannheim, Alemania), sonicados a 4 °C y centrifugados durante 15 minutos a 21.000 g. El sobrenadante, el lisado muscular humano, se almacenó a -80 °C hasta su uso en cromatografía de inmunoafinidad.

45

50 **[0110]** El lisado muscular humano que contenía 10 mg de proteína se incubó con 250 µl de perlas de proteína A-agarosa (50 % de suspensión) en tampón RIPA para eliminar la IgG endógena del lisado muscular. Posteriormente, se añadieron 50 µl de perlas acopladas con anticuerpos al lisado muscular preacclarado y se incubaron durante 16 horas a 4 °C. Las perlas acopladas con anticuerpos se lavaron 5 veces con tampón RIPA y las proteínas unidas se liberaron hirviendo en el tampón de muestra SDS (SDS al 2 %, 5 % β-mercaptoetanol, glicerol al 10 %, bromofenol bleu al 0,01 %, Tris-HCl 125 mM, pH 6,8). Las proteínas unidas se separaron mediante SDS-PAGE al 12 % y se visualizaron mediante tinción con azul brillante de Coomassie coloidal.

55

[0111] Se cortó una rebanada de gel que contenía la banda de proteína correspondiente a la posición de Mup44 del gel y, después de la reducción y la alquilación, se digirió en gel con tripsina. Las muestras digeridas se cargaron en baquetas para la desalación y concentración y se eluyeron en un volumen final de 20 µl, de los cuales se utilizaron 5 µl para el análisis por medio del equipo nanoLC LTQ FT Ultra MS de Nijmegen Proteomics Facility (NPF). En resumen, la mezcla de péptidos se resolvió mediante cromatografía de nano-HPLC de fase inversa (RP) antes de la ionización por nanoelectrospray. Los iones peptídicos se analizaron con el espectrómetro de masas LTQ FT Ultra MS.

[0112] Las identificaciones de péptidos y proteínas se extrajeron de los datos mediante el programa de búsqueda Mascot (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html). En este caso, la base de datos RefSeq33 con la taxonomía Homo sapiens se usó con etiquetas de secuencia agregadas. Se agregaron probables contaminantes a esta base de datos (por ejemplo, queratinas humanas, tripsina y LysC). Se permitieron las siguientes modificaciones en la búsqueda: carbamidometilación de cisteínas (fijas), oxidación de metionina (variable) y acetilación del extremo N (variable).

[0113] Las identidades de proteínas se validaron mediante software que clasificaba las identificaciones de proteínas según el número de secuencias de péptidos identificadas de forma única, agrupando proteínas que comparten el mismo conjunto de péptidos y validando las proteínas según los siguientes criterios: las proteínas con 1 péptido deben tener una puntuación de péptido: >49; las proteínas con más de 1 péptido deben tener una puntuación de péptido: >29.

RESULTADOS

[0114] El análisis de los resultados de LC-MS/MS de las bandas extraídas correspondientes a Mup44 reveló que Mup44 corresponde a la 5'-nucleotidasa IA (NP_115915.1). Las puntuaciones de emPAI (índice modificado de abundancia de proteínas de forma exponencial; http://www.matrixscience.com/help/quantempai_help.html) de la 5'-nucleotidasa IA, que es la proteína con la puntuación más alta en la lista de resultados de LC-MS/MS, fueron 5.4, 9 y 0.9 para las dos muestras de anticuerpos de MCI y de control, lo cual está en consonancia con las intensidades de las bandas de proteínas observadas. Debido a que estas altas puntuaciones de emPAI solo se obtuvieron para la 5'-nucleotidasa IA y ninguna de las otras proteínas identificadas mostró una diferenciación similar entre la MCI y las muestras de control, estos resultados demuestran que la proteína de 44 kDa dirigida a los anticuerpos del paciente de MCI es la 5'-nucleotidasa citosólica IA. Es importante destacar que esta proteína se sabe que se expresa en niveles relativamente altos en el tejido muscular esquelético.

Ejemplo 3: Identificación de las principales zonas de epítipo de la 5'-nucleotidasa IA dirigidas a los sueros de MCI

[0115] Para obtener más información sobre las zonas de 5'-nucleotidasa IA a las que se dirigen de manera preferencial los sueros de MCI, se generaron microarreglos que contienen un conjunto de péptidos sintéticos superpuestos que cubren la secuencia completa de aminoácidos de la 5'-nucleotidasa IA (SEQ ID NO: 1) y se sondaron con sueros anti-Mup44 positivos. En total, se sintetizaron noventa péptidos de 15-mer con una superposición de 11 aminoácidos y se colocaron por triplicado en la superficie del portaobjetos de vidrio. Estos microarreglos se adquirieron de JPT Peptide Technologies (Berlín, Alemania). Cada portaobjetos contenía tres arreglos de péptidos idénticos. Los portaobjetos se bloquearon mediante incubación con MTBST (leche deshidratada al 5 % en TBS, Tween-20 al 0,05 %) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, los portaobjetos se incubaron con 300 µl de sueros de pacientes diluidos 100 veces en MTBST durante 2 horas a 37 °C en una cámara húmeda. Después de lavar 5 veces con MTBST, los arreglos se incubaron con anticuerpos secundarios de cabra antihumanos marcados con Alexa Fluor-568 (A21090, Molecular Probes) durante 1 hora a 30 °C en agitación. Después de lavar 5 veces con MTBST y 5 veces con agua, los portaobjetos se secaron y los anticuerpos unidos se visualizaron mediante un escáner de microarrays PerkinElmer ProScanArray. Las señales se cuantificaron utilizando el software Quantity One (Bio-Rad).

[0116] Se incubaron nueve portaobjetos con sueros de MCI que contenían autoanticuerpos anti-Mup44 y dos con sueros de control sanos normales. Se identificaron tres zonas principales de epítipo. Uno de estos, ubicado cerca del término N, comprende residuos de los aminoácidos 25 a 50. Algunos sueros también mostraron reactividades débiles con péptidos que contienen partes de los 24 aminoácidos N-terminales. Una segunda zona autorreactiva está ubicada cerca del extremo C (aminoácidos 341 a 368). La tercera zona del epítipo está ubicada más centralmente (aminoácidos 221 a 243). Los sueros de control no fueron reactivos con ninguno de los péptidos 5'-nucleotidasa IA en los arreglos. Estos datos sugieren que la 5'-nucleotidasa IA contiene al menos tres autoepítipos discontinuos.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0117]

<110> Stichting Katholieke Universiteit

<120> Miositis

ES 2 704 120 T3

<130> P30809NL00

<150> US 61/505,233

5 <151> 2011-07-07

<150> NL2007065

<151> 2011-07-07

10 <160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

15 <211> 368

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Glu Pro Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Glu Pro Arg Glu Pro Gly
1          5          10          15

Pro Gly Ala Glu Thr Ala Ala Ala Pro Val Trp Glu Glu Ala Lys Ile
          20          25          30

Phe Tyr Asp Asn Leu Ala Pro Lys Lys Lys Pro Lys Ser Pro Lys Pro
          35          40          45

Gln Asn Ala Val Thr Ile Ala Val Ser Ser Arg Ala Leu Phe Arg Met
          50          55          60

Asp Glu Glu Gln Gln Ile Tyr Thr Glu Gln Gly Val Glu Glu Tyr Val
65          70          75          80

Arg Tyr Gln Leu Glu His Glu Asn Glu Pro Phe Ser Pro Gly Pro Ala
          85          90          95

Phe Pro Phe Val Lys Ala Leu Glu Ala Val Asn Arg Arg Leu Arg Glu
          100          105          110

Leu Tyr Pro Asp Ser Glu Asp Val Phe Asp Ile Val Leu Met Thr Asn
          115          120          125

Asn His Ala Gln Val Gly Val Arg Leu Ile Asn Ser Ile Asn His Tyr
          130          135          140

Asp Leu Phe Ile Glu Arg Phe Cys Met Thr Gly Gly Asn Ser Pro Ile
145          150          155          160

```

20

ES 2 704 120 T3

Cys Tyr Leu Lys Ala Tyr His Thr Asn Leu Tyr Leu Ser Ala Asp Ala
 165 170 175

Glu Lys Val Arg Glu Ala Ile Asp Glu Gly Ile Ala Ala Ala Thr Ile
 180 185 190

Phe Ser Pro Ser Arg Asp Val Val Val Ser Gln Ser Gln Leu Arg Val
 195 200 205

Ala Phe Asp Gly Asp Ala Val Leu Phe Ser Asp Glu Ser Glu Arg Ile
 210 215 220

Val Lys Ala His Gly Leu Asp Arg Phe Phe Glu His Glu Lys Ala His
 225 230 235 240

Glu Asn Lys Pro Leu Ala Gln Gly Pro Leu Lys Gly Phe Leu Glu Ala
 245 250 255

Leu Gly Arg Leu Gln Lys Lys Phe Tyr Ser Lys Gly Leu Arg Leu Glu
 260 265 270

Cys Pro Ile Arg Thr Tyr Leu Val Thr Ala Arg Ser Ala Ala Ser Ser
 275 280 285

Gly Ala Arg Ala Leu Lys Thr Leu Arg Ser Trp Gly Leu Glu Thr Asp
 290 295 300

Glu Ala Leu Phe Leu Ala Gly Ala Pro Lys Gly Pro Leu Leu Glu Lys
 305 310 315 320

Ile Arg Pro His Ile Phe Phe Asp Asp Gln Met Phe His Val Ala Gly
 325 330 335

Ala Gln Glu Met Gly Thr Val Ala Ala His Val Pro Tyr Gly Val Ala
 340 345 350

Gln Thr Pro Arg Arg Thr Ala Pro Ala Lys Gln Ala Pro Ser Ala Gln
 355 360 365

<210> 2

<211> 550

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Gln Thr Ser Leu Lys Gln Lys Lys Asn Glu Pro Gly Met Arg
 1 5 10 15

Ser Ser Lys Glu Ser Leu Glu Ala Glu Lys Arg Lys Glu Ser Asp Lys
 20 25 30

ES 2 704 120 T3

Thr Gly Val Arg Leu Ser Asn Gln Gly Ser Gln Glu Ser Ser Leu Arg
35 40 45

Lys Thr Asp Ser Arg Gly Tyr Leu Val Arg Ser Gln Trp Ser Arg Ile
50 55 60

Ser Arg Ser Pro Ser Thr Lys Ala Pro Ser Ile Asp Glu Pro Arg Ser
65 70 75 80

Arg Asn Thr Ser Ala Lys Leu Pro Ser Ser Ser Thr Ser Ser Arg Thr
85 90 95

Pro Ser Thr Ser Pro Ser Leu His Asp Ser Ser Pro Pro Pro Leu Ser
100 105 110

Gly Gln Pro Ser Leu Gln Pro Pro Ala Ser Pro Gln Leu Pro Arg Ser
115 120 125

Leu Asp Ser Arg Pro Pro Thr Pro Pro Glu Pro Asp Pro Gly Ser Arg
130 135 140

Arg Ser Thr Lys Met Gln Glu Asn Pro Glu Ala Trp Ala Gln Gly Ile
145 150 155 160

Val Arg Glu Ile Arg Gln Thr Arg Asp Ser Gln Pro Leu Glu Tyr Ser
165 170 175

Arg Thr Ser Pro Thr Glu Trp Lys Ser Ser Ser Gln Arg Arg Gly Ile
180 185 190

Tyr Pro Ala Ser Thr Gln Leu Asp Arg Asn Ser Leu Ser Glu Gln Gln
195 200 205

Gln Gln Gln Arg Glu Asp Glu Asp Asp Tyr Glu Ala Ala Tyr Trp Ala
210 215 220

Ser Met Arg Ser Phe Tyr Glu Lys Asn Pro Ser Cys Ser Arg Pro Trp
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asn Ala Ile Thr Ile Ala Leu Ser Ser Cys Ala
245 250 255

Leu Phe Asn Met Val Asp Gly Arg Lys Ile Tyr Glu Gln Glu Gly Leu
260 265 270

Glu Lys Tyr Met Glu Tyr Gln Leu Thr Asn Glu Asn Val Ile Leu Thr
275 280 285

ES 2 704 120 T3

Pro Gly Pro Ala Phe Arg Phe Val Lys Ala Leu Gln Tyr Val Asn Ala
 290 295 300

Arg Leu Arg Asp Leu Tyr Pro Asp Glu Gln Asp Leu Phe Asp Ile Val
 305 310 315 320

Leu Met Thr Asn Asn His Ala Gln Val Gly Val Arg Leu Ile Asn Ser
 325 330 335

Val Asn His Tyr Gly Leu Leu Ile Asp Arg Phe Cys Leu Thr Gly Gly
 340 345 350

Lys Asp Pro Ile Gly Tyr Leu Lys Ala Tyr Leu Thr Asn Leu Tyr Ile
 355 360 365

Ala Ala Asp Ser Glu Lys Val Gln Glu Ala Ile Gln Glu Gly Ile Ala
 370 375 380

Ser Ala Thr Met Phe Asp Gly Ala Lys Asp Met Ala Tyr Cys Asp Thr
 385 390 395 400

Gln Leu Arg Val Ala Phe Asp Gly Asp Ala Val Leu Phe Ser Asp Glu
 405 410 415

Ser Glu His Phe Thr Lys Glu His Gly Leu Asp Lys Phe Phe Gln Tyr
 420 425 430

Asp Thr Leu Cys Glu Ser Lys Pro Leu Ala Gln Gly Pro Leu Lys Gly
 435 440 445

Phe Leu Glu Asp Leu Gly Arg Leu Gln Lys Lys Phe Tyr Ala Lys Asn
 450 455 460

Glu Arg Leu Leu Cys Pro Ile Arg Thr Tyr Leu Val Thr Ala Arg Ser
 465 470 475 480

Ala Ala Ser Ser Gly Ala Arg Val Leu Lys Thr Leu Arg Arg Trp Gly
 485 490 495

Leu Glu Ile Asp Glu Ala Leu Phe Leu Ala Gly Ala Pro Lys Ser Pro
 500 505 510

Ile Leu Val Lys Ile Arg Pro His Ile Phe Phe Asp Asp His Met Phe
 515 520 525

His Ile Glu Gly Ala Gln Arg Leu Gly Ser Ile Ala Ala Tyr Gly Phe
 530 535 540

Asn Lys Lys Phe Ser Ser
 545 550

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para identificar un sujeto en riesgo de desarrollar miositis por cuerpos de inclusión, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 - 5 a) proporcionar una muestra de prueba obtenida de dicho sujeto; y
 - b) determinar si los autoanticuerpos contra la 5'-nucleotidasa están presentes en dicha muestra.

2. Un procedimiento para distinguir entre los subtipos de miopatía inflamatoria idiopática en el que dicha miopatía inflamatoria idiopática es dermatomiositis o polimiositis o miositis por cuerpos de inclusión, en un sujeto que padece una
 - 10 miopatía inflamatoria idiopática, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 - a) proporcionar una muestra de prueba obtenida de dicho sujeto;
 - b) determinar si los autoanticuerpos contra la 5'-nucleotidasa están presentes o ausentes en dicha muestra.

3. Un procedimiento para controlar la progresión de la miositis por cuerpos de inclusión en un sujeto y/o para
 - 15 determinar la respuesta a la terapia que trata la miositis por cuerpos de inclusión en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 - a) proporcionar una primera muestra de prueba obtenida de dicho sujeto en un primer punto de tiempo y una segunda muestra de prueba obtenida de dicho sujeto en un segundo punto de tiempo;
 - b) determinar el nivel de autoanticuerpos contra la 5'-nucleotidasa en dichas primera y segunda muestras;
 - 20 c) comparar el nivel de anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa en dicha primera muestra con dicha segunda muestra.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que
 - la 5'-nucleotidasa es NT5C1A (5'-nucleotidasa humana, citosólica IA) o NT5C1B (5'-nucleotidasa humana, IB citosólica) y/o
 - 25 - la 5'-nucleotidasa comprende al menos 30 aminoácidos adyacentes de la SEQ ID NO:1 y/o la SEQ ID NO:2, o de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO:1 y/o la SEQ ID NO:2.

5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de determinar la presencia y/o nivel de anticuerpos contra la 5'-nucleotidasa se realiza determinando la interacción entre dichos
 - 30 anticuerpos con la 5'-nucleotidasa y/o con un fragmento de dicha 5'-nucleotidasa, en el que dicho fragmento es un fragmento de al menos 7 aminoácidos adyacentes derivados de dicha 5'-nucleotidasa, en el que el fragmento comprende al menos 7 aminoácidos adyacentes de una zona de 5'-nucleotidasa seleccionada de entre el grupo que consiste en : - una zona de los aminoácidos 25 a 50 de la SEQ ID NO:1; - una zona de los aminoácidos 221 a 243 de la SEQ ID NO:1; y - una zona de los aminoácidos 341 a 368 de la SEQ ID NO:1.
 - 35

6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la 5'-nucleotidasa utilizada para determinar la interacción con el anticuerpo, o de la que se deriva el fragmento utilizado para determinar la interacción con el anticuerpo, es NT5C1A (5'-nucleotidasa humana, citosólica IA) o NT5C1B (5'-nucleotidasa humana, citosólica IB).
 - 40

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que
 - la muestra de prueba es una muestra de sangre y/o el sujeto es un sujeto humano; y/o
 - el procedimiento comprende además la etapa de determinar la presencia de anticuerpos contra al menos un antígeno seleccionado de entre el grupo que consiste en Mi-2, Ku, PM/Scl-100, PM/Scl-75, SRP, OJ, EJ, PL-12, PL-7, Ro-52,
 - 45 Jo-1, HisRS, ThrRS, AlaRS, GlyRS, IleRS, AsnRS, TyrRS, PheRS, ARNtHis, ARNtAla, Mi-2alpha, Mi-2beta, SRP54, SRP68, SRP72, Tif1-gamma, MDA5, SAE1, SAE2, serina-ARNtSec-complejo proteico, Ro60, La, U1A, U1C, U1-70k, PMS1, PMS2, Ku70, Ku80, eEF1, RNP nuclear y NXP-2 en la muestra de prueba; y/o
 - dicha 5'-nucleotidasa es la 5'-nucleotidasa recombinante purificada.

8. Un kit que comprende medios para detectar autoanticuerpos contra la 5'-nucleotidasa presente en una muestra de prueba tomada de un sujeto, en el que el kit comprende 5'-nucleotidasa o un fragmento de dicha 5'-nucleotidasa, en el que dicho fragmento es un fragmento de al menos 7 aminoácidos adyacentes derivados de dicha 5'-nucleotidasa como medio para detectar autoanticuerpos contra la 5'-nucleotidasa, y en el que
 - 50 la 5'-nucleotidasa o un fragmento de dicha 5'-nucleotidasa está fijada a una membrana, inmunotransferencia, perlas, perlas magnéticas, vehículos, ligadores de proteínas o superficies.
 - 55

9. Kit según la reivindicación 8 en el que el fragmento comprende al menos 7 aminoácidos adyacentes de una zona de 5'-nucleotidasa seleccionada de entre el grupo que consiste en: - una zona de los aminoácidos 25 a 50 de la SEQ ID NO:1; - una zona de los aminoácidos 221 a 243 de la SEQ ID NO:1; y - una zona de los aminoácidos 341 a 368 de la SEQ ID NO: 1.
 - 60

10. Kit según la reivindicación 9 en el que:
 - el kit comprende además al menos un antígeno seleccionado de entre el grupo que consiste en Mi-2, Ku, PM/Scl-100, PM/Scl-75, SRP, OJ, EJ, PL-12, PL-7, Ro-52, Jo-1, HisRS, ThrRS, AlaRS, GlyRS, IleRS, AsnRS, TyrRS, PheRS,
 - 65 ARNtHis, ARNtAla, Mi-2alpha, Mi-2beta, SRP54, SRP68, SRP72, Tif1-gamma, MDA5, SAE1, SAE2, serina-ARNtSec-

complejo proteico, Ro60, La, U1A, U1C, U1-70k, PMS1, PMS2, Ku70, Ku80, eEF1, RNP nuclear y NXP-2; y/o
- dicha 5'-nucleotidasa es la 5'-nucleotidasa recombinante purificada.

11. Uso de la 5'-nucleotidasa y/o uso de un fragmento de dicha 5'-nucleotidasa, en el que dicho fragmento es un
5 fragmento de al menos 7 aminoácidos adyacentes derivados de dicha 5'-nucleotidasa para detectar autoanticuerpos
presentes en una muestra de prueba obtenida de un sujeto.

12. Uso según la reivindicación 11 en el que:

- la 5'-nucleotidasa, utilizada para detectar los autoanticuerpos, o de la cual se deriva el fragmento utilizado para
10 determinar la interacción con el autoanticuerpo, comprende al menos 30 aminoácidos adyacentes de la SEQ ID NO:1
y/o la SEQ ID NO:2, o de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO:1
y/o la SEQ ID NO:2, y/o
- el fragmento comprende al menos 7 aminoácidos adyacentes de una zona de 5'-nucleotidasa seleccionada de entre
el grupo que consiste en: - una zona de los aminoácidos 25 a 50 de la SEQ ID NO:1; - una zona de los aminoácidos
15 221 a 243 de la SEQ ID NO:1; y - una zona de los aminoácidos 341 a 368 de la SEQ ID NO:1; y/o
- dicha 5'-nucleotidasa es la 5'-nucleotidasa recombinante purificada.

13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12 para identificar a un sujeto con riesgo de desarrollar miositis
por cuerpos de inclusión y/o diagnosticar a un sujeto que padece miositis por cuerpos de inclusión, y/o controlar la
20 progresión de la miositis por cuerpos de inclusión en un sujeto.