

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 216**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2010 PCT/CA2010/000368**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.09.2010 WO10102412**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2010 E 10750298 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 2406633**

54 Título: **Composiciones y métodos para caracterizar afecciones artríticas**

30 Prioridad:

11.03.2009 US 159386 P

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

27.05.2019

73 Titular/es:

**AUGUREX LIFE SCIENCES CORP. (100.0%)
Unit 220 - 887 Great Northern Way
Vancouver, BC V5T 4T5 , CA**

72 Inventor/es:

MAROTTA, ANTHONY

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 714 216 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para caracterizar afecciones artríticas

Campo

5 Se describen en este documento métodos para evaluar una afección artrítica en un sujeto, y kits que comprenden autoanticuerpos para la proteína eta 14-3-3 para evaluar afecciones artríticas.

Antecedentes

10 La artritis, o artralgia, generalmente se refiere a trastornos inflamatorios de las articulaciones del cuerpo, y usualmente se acompaña de dolor, hinchazón y rigidez. La artritis se puede deber a cualquiera de las diversas causas, que incluyen infecciones, traumas, trastornos degenerativos, trastornos o alteraciones metabólicos u otras etiologías desconocidas. La osteoartritis (OA) es una forma común de artritis no inflamatoria que puede ocurrir
15 a una pérdida sustancial de movilidad debido al dolor y la destrucción de las articulaciones. La espondilitis anquilosante (AS) es una artritis inflamatoria, degenerativa, crónica y dolorosa que afecta principalmente a la columna vertebral y las articulaciones sacroilíacas, que provoca la fusión final de la columna vertebral.

20 Las articulaciones del cuerpo se denominan articulaciones sinoviales, y cada articulación sinovial generalmente comprende los extremos opuestos de dos huesos adyacentes. Los extremos de los huesos están encerrados en tejido de cartílago, mientras que toda el área de la articulación está encerrada en un tejido blando protector llamado sinovio que comprende una membrana sinovial. La membrana sinovial produce y libera un líquido sinovial lubricante en cavidades dentro de la articulación. En las articulaciones normales, el volumen de líquido sinovial es bastante pequeño. Además de su función lubricante, el líquido sinovial también actúa como un reservorio para los solutos y unas pocas células mononucleares y sinoviales en reposo.

25 El sinovio se puede irritar y engrosar en respuesta a muchas lesiones que se considera promueven la artritis, que incluyen el traumatismo de la articulación y/o el mal funcionamiento del sistema inmunológico del cuerpo. Las consecuencias de dichas lesiones incluyen la producción excesiva y la liberación de líquido sinovial en la articulación, provocando de esta manera hinchazón dentro y alrededor del área de la articulación. El aumento de los volúmenes normalmente se acompaña de un aumento de las concentraciones en el líquido sinovial de las células
30 sinoviocíticas similares a los fibroblastos (células FLS), las citoquinas proinflamatorias tales como la interleuquina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF-alfa), las proteínas de histamina y péptidos, y enzimas degradativas tales como metaloproteasas de matriz (MMP). Las células FLS comprenden aproximadamente dos tercios de las células sinoviales en el líquido sinovial normal, tienen sistemas secretores bien definidos y bajo condiciones de trauma o inflamación comúnmente segregan grandes cantidades de MMP en el líquido sinovial, específicamente MMP-1, 3, 8,
35 9, 10, 11 y 13. Se considera que MMP-1 y MMP-3 tienen funciones significativas en el daño estructural progresivo del cartílago y los tejidos óseos subyacentes que comprenden las articulaciones. Los factores conocidos que activan las células FLS para producir MMP-1 y MMP-3 incluyen IL-1 y TNF-alfa.

40 Los agentes causales para RA, AS y OA actualmente no están bien definidos. Sin embargo, se conocen los eventos fisiológicos asociados con la progresión de la enfermedad, desde períodos prolongados de hinchazón e inflamación causados por una acumulación excesiva de líquido sinovial en las articulaciones, a través de la degradación y deterioro del cartílago y de los tejidos óseos subyacentes por las actividades enzimáticas degradativas, y las células FLS que lo acompañan en huesos que resulta en daño estructural permanente. Si se detecta lo suficientemente temprano, los posibles efectos perjudiciales a largo plazo de la enfermedad pueden revertirse, o al menos minimizarse, con terapias físicas y médicas apropiadas. De acuerdo con lo anterior, se han realizado considerables
45 esfuerzos en la identificación de biomarcadores adecuados para la identificación temprana de la artritis. Con este fin, Kilani et al. (2007, J. Rheum. 34: 1650-1657; WO 2007/128132) han informado que dos miembros de la familia de proteínas 14-3-3, particularmente eta 14-3-3 y gamma 14-3-3, están presentes dentro del líquido sinovial y el suero de pacientes con artritis, y estas isoformas están directamente relacionadas con los niveles de MMP-1 y MMP-3 en el líquido sinovial y el suero.

50 Resumen

La presente invención se refiere al hallazgo de que la presencia de autoanticuerpos se dirige contra la proteína(s) eta 14-3-3 en las muestras biológicas se correlaciona con diagnóstico y/o pronóstico de una afección artrítica. La correlación fuerte entre dichos autoanticuerpos y una afección artrítica permite el diagnóstico y/o pronóstico de la afección artrítica al ensayar para autoanticuerpos contra, o hacer complejos inmunitarios con por lo menos una
55 proteína 14-3-3 o un fragmento de la misma en una muestra biológica de un sujeto.

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

- De acuerdo con lo anterior, se describe en este documento un método para evaluar una afección artrítica en un sujeto mamífero, que comprende: a) proporcionar una muestra de un sujeto mamífero del que se sospecha tiene una afección artrítica; b) detectar en dicha muestra la presencia de un autoanticuerpo contra por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta 14-3-3; en el que la presencia de dicho autoanticuerpo es indicativa de una afección artrítica que implica dicho autoanticuerpo en el sujeto
- 5 en el que la etapa de detección comprende poner en contacto la muestra biológica con por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta 14-3-3,
- en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste de sangre, fluido sinovial, plasma, suero o tejido.
- También se proporciona un método para evaluar una afección artrítica en un sujeto mamífero, que comprende: a) proporcionar una muestra de un sujeto mamífero del que se sospecha tiene una afección artrítica; b) detectar en dicha muestra la presencia de un complejo inmunitario que comprende i) un autoanticuerpo contra por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta 14-3-3 y ii) por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta 14-3-3; en el que la presencia de dicho complejo inmunitario es indicativo de una afección artrítica que implica dicho autoanticuerpo en el sujeto
- 10
- 15 en el que la etapa de detección comprende poner en contacto la muestra biológica con una molécula de unión unida a un soporte sólido para la detección de dicho complejo inmunitario
- en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste de sangre, fluido sinovial, plasma, suero o tejido.
- La proteína 14-3-3 o fragmento de la misma comprende un epítipo eta 14-3-3. En una realización, la proteína 14-3-3 o fragmento de la misma comprende un epítipo eta 14-3-3 compartido por al menos otra isoforma 14-3-3, por ejemplo, gamma 14-3-3. En otra realización, el epítipo eta 14-3-3 es único para eta 14-3-3.
- 20 En una realización, la etapa de detección comprende medir la cantidad de dicho complejo de autoanticuerpo o inmunitario y compararlo contra la cantidad de complejo de autoanticuerpo o inmunitario en una muestra de control, una muestra de control artrítica, o en una muestra previa del mismo sujeto.
- 25 De acuerdo con lo anterior, los métodos actualmente reivindicados para evaluar una afección artrítica en un sujeto pueden proporcionar determinaciones de pronóstico, así como también de diagnóstico.
- La muestra de control puede ser un control normal, y la comparación es indicativa de un diagnóstico de artritis. En una realización, un nivel en aumento de autoanticuerpo contra, o complejos inmunitarios con, la proteína eta 14-3-3 o un fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta en dicha muestra biológica en comparación con una muestra de control normal (por ejemplo, de otro sujeto que no tiene una afección artrítica) es un indicador diagnóstico de una afección artrítica en dicho sujeto.
- 30 De acuerdo con lo anterior, en algunas realizaciones, la presencia de autoanticuerpos para la proteína eta 14-3-3 o complejos inmunitarios de la misma en la muestra biológica del sujeto y/o la presencia de un nivel en aumento de dichos autoanticuerpos o complejos inmunitarios en la muestra biológica del sujeto con relación a un nivel de dichos autoanticuerpos o complejos inmunitarios en una muestra de control normal (es decir no artrítica) proporciona un diagnóstico de que el sujeto tiene una afección artrítica.
- 35 La muestra de control puede ser una muestra biológica previa del sujeto mamífero, y la comparación es indicativa de la progresión de la enfermedad y/o eficacia de un régimen terapéutico. En una realización, un nivel reducido de autoanticuerpos para la proteína eta 14-3-3 o complejos inmunitarios en circulación de la misma en dicha muestra en comparación con la muestra previa (por ejemplo, una muestra biológica de referencia de dicho sujeto) es indicativo de la eficacia de un régimen terapéutico en curso.
- 40 De acuerdo con lo anterior, en algunas realizaciones, el nivel relativo de autoanticuerpos contra, o complejos inmunitarios con, la proteína eta 14-3-3 o un fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta detectado en la muestra biológica del sujeto en comparación con el nivel de dichos autoanticuerpos o complejos presentes en una muestra biológica de referencia del mismo sujeto proporcionan un pronóstico de la afección artrítica, o son indicativos de la eficacia de un régimen terapéutico.
- 45 La muestra de control puede ser un control artrítico, y la comparación es indicativa de pronóstico de enfermedad. En una realización, el nivel relativo de autoanticuerpos para la proteína eta 14-3-3 o complejos inmunitarios de la misma en comparación con una muestra de control artrítica (por ejemplo, de otro sujeto con una afección artrítica bien definida) es un indicador pronóstico de artritis.
- 50 De acuerdo con lo anterior, en algunas realizaciones, los sujetos con diferente estado artrítico tienen diferencias detectables en los niveles de autoanticuerpos para por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta, y/o complejos inmunitarios en circulación de dichas, y estas diferencias son de relevancia pronóstica. En un ejemplo, se divulgan en este documento métodos que se pueden utilizar para

determinar una etapa de enfermedad específica o el fenotipo histopatológico de una afección artrítica con base en el nivel relativo de autoanticuerpo detectado en un sujeto en comparación con los niveles previamente determinados para existir a lo largo del curso de la afección artrítica, por ejemplo, antes de tratamiento, durante tratamiento, después de tratamiento, en otro paciente, etc. En otro ejemplo, los métodos divulgados en este documento se pueden utilizar para clasificar una muestra biológica que es de un sujeto en alto riesgo de manifestación de una afección artrítica con base en el nivel relativo de autoanticuerpos detectados en la muestra biológica en comparación con una muestra de control, que puede ser, por ejemplo, almacenada en una base de datos.

Los métodos divulgados en este documento se pueden utilizar para predecir la capacidad de respuesta de un sujeto en un régimen terapéutico con base en el nivel relativo de autoanticuerpos detectados en una muestra biológica del sujeto en comparación con una muestra de control, por ejemplo, de una segunda muestra biológica de un segundo sujeto que fue tratado con éxito con el régimen terapéutico.

De acuerdo con lo anterior, en algunas realizaciones, se conoce el nivel relativo de autoanticuerpos contra, o complejos inmunitarios con, por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta en la muestra biológica del primer sujeto está en comparación con el nivel de autoanticuerpos contra, o complejos inmunitarios con, 14-3-3 en las muestras biológicas de sujetos cuyas capacidades responden a un tratamiento, en el que dicha comparación determina la respuesta potencial del primer sujeto al tratamiento. La determinación de la sensibilidad del sujeto a un régimen terapéutico luego se puede utilizar para reportar los métodos para tratar un sujeto con una afección artrítica. Por ejemplo, se describen en este documento métodos para tratar un sujeto con una afección artrítica que comprende medir el nivel de autoanticuerpo contra eta 14-3-3 en una muestra biológica del sujeto (por ejemplo, al medir el nivel de la formación del complejo inmunitario de autoanticuerpo/eta 14-3-3), correlacionar el nivel de autoanticuerpo contra o complejo inmunitario con eta 14-3-3 con la sensibilidad del sujeto a un régimen terapéutico, y proporcionar el régimen terapéutico al sujeto. En un aspecto, la invención proporciona métodos para monitorizar el tratamiento de una afección artrítica, que comprender determinar el nivel de autoanticuerpos contra, o complejos inmunitarios con, por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta en muestras de pacientes y monitorizar el nivel de complejos de autoanticuerpos/inmunitarios que involucran eta 14-3-3 en un paciente que experimenta el tratamiento.

La presente invención puede ser útil en determinar y/o diferenciar los subtipos de artritis en un paciente. En este aspecto, el nivel relativo de autoanticuerpos contra, o complejos inmunitarios con, por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta en la muestra biológica del primer sujeto se compara con el nivel de autoanticuerpos contra, o complejos inmunitarios con, 14-3-3 en las muestras biológicas de uno o más sujetos cuyo subtipo de artritis se conoce y/o se establece previamente, en el que dicha comparación determina el subtipo de artritis para el primer sujeto.

La determinación de que los niveles de autoanticuerpos contra, o complejos inmunitarios con, por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta en la muestra biológica del primer sujeto son similares a los niveles de autoanticuerpos contra, o complejos inmunitarios con, por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta en la muestra biológica a partir de la muestra biológica de otro sujeto cuyo subtipo de artritis que se conoce y/o se establece previamente puede indicar que el primer sujeto tiene el mismo subtipo de artritis como el otro sujeto. Por ejemplo, niveles similares de autoanticuerpos contra, o complejos inmunitarios con, por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta en la muestra biológica del primer sujeto y en la muestra biológica de otro sujeto conocido por tener artritis inflamatoria, por ejemplo, artritis reumatoide, puede determinar que el primer sujeto también tiene artritis inflamatoria, por ejemplo, artritis reumatoide.

Adicionalmente, la determinación de que los niveles de autoanticuerpos contra, o complejos inmunitarios con, por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta en la muestra biológica del primer sujeto son diferentes a los niveles de autoanticuerpos contra, o complejos inmunitarios con, por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta en la muestra biológica a partir de de la muestra biológica de otro sujeto cuyo subtipo de artritis que se conoce y/o se establece previamente puede indicar que el primer sujeto tiene un subtipo de artritis diferente que aquel del otro sujeto. Por ejemplo, niveles distintos de autoanticuerpos contra, o complejos inmunitarios con, por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta en la muestra biológica del primer sujeto y en la muestra biológica de otro sujeto del que se sabe tiene artritis no inflamatoria, por ejemplo, osteoartritis, puede determinar que el primer sujeto tiene una artritis inflamatoria, por ejemplo, artritis reumatoide.

En una realización, la etapa de detección comprende una técnica de base inmunológica, por ejemplo, inmunoprecipitación, ELISA, análisis de transferencia Western, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, inmunoensayos "intercalado", ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitación por difusión de gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos in situ, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos de proteína A, ensayos de inmunoelectroforesis, análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), radioinmunoensayo y similares.

La detección y/o medición de autoanticuerpos contra una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta de acuerdo con los métodos descritos en este documento de esta manera

se pueden realizar al observar la formación de un complejo inmunitario entre el autoanticuerpo y proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta en una muestra, o alternativamente determinar la presencia de un complejo de autoanticuerpo/eta 14-3-3 existente en una muestra. En una realización, la formación se puede detectar por medio de proteínas 14-3-3 marcadas detectablemente o fragmentos de las mismas. En otra realización, se puede detectar el complejo al formar un segundo complejo inmunitario entre el complejo de autoanticuerpo/eta 14-3-3 y un anticuerpo secundario marcado detectablemente que une la inmunoglobulina, por ejemplo, la estructura principal de inmunoglobulina del autoanticuerpo.

En una realización, los métodos implican detectar autoanticuerpos contra 14-3-3 o complejos inmunitarios en circulación de los mismos en la sangre, fluido sinovial, plasma, suero, o tejido (por ejemplo, articulación sinovial, tejido de articulación dañado, etc.) de un paciente. En una realización, se realiza detección mediante inmunoprecipitación de autoanticuerpos contra eta 14-3-3 de sangre, fluido sinovial, plasma, suero o tejido utilizando la proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta. En una realización, la detección implica el uso de ELISA. En una realización, la detección implica análisis de transferencia Western de una muestra que comprende fluido sinovial, plasma, o suero de un paciente. En una realización, la detección implica el uso de radioinmunoensayo. En una realización, la detección implica el uso de una prueba de tira. En una realización, la detección implica el uso de un punto de prueba de cuidado. En una realización, la detección de autoanticuerpos contra eta 14-3-3 o complejos en circulación de los mismos se combina con la detección de otro marcador de artritis (por ejemplo, MMP, anti-CCP, anti-RF y/o CRP).

También se describe en este documento el uso de un kit para detectar la presencia en una muestra de un autoanticuerpo para por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta 14-3-3, para evaluar una afección artrítica en un sujeto mamífero, en el que el kit comprende por lo menos dicha proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta 14-3-3 y un reactivo secundario, en el que el reactivo secundario se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo secundario marcado, un reactivo cromogénico o fluorogénico, y un agente de polimerización. El reactivo secundario puede ser un anticuerpo secundario marcado para la detección de un autoanticuerpo para dicha proteína 14-3-3. El anticuerpo secundario marcado puede ser un anticuerpo antihumano.

El método de la invención puede comprender adicionalmente la detección de por lo menos un marcador de artritis adicional en dicha muestra biológica, en el que dicho por lo menos un marcador de artritis adicional se selecciona del grupo que consiste de proteína eta 14-3-3, matriz de metaloproteinasa-1 (MMP-1), MMP-3, péptido citrulinado anticíclico (CCP), factor reumatoide (RF), proteína reactiva c (CRP), amiloide A en suero (SAA), interleuquina 6 (IL-6), proteína de unión a calcio S100, osteopontina, ácido hialurónico, agrupación soluble de diferenciación 14 (sCD14), telopéptido de entrecruzamiento de terminal c de tipo I (CTX-I) y colágeno tipo II (CTX-II).

La proteína 14-3-3 o fragmento de la misma comprende un epítipo eta 14-3-3. En una realización, la proteína 14-3-3 o fragmento de la misma comprende un epítipo eta 14-3-3 compartido por a menos otra isoforma 14-3-3, por ejemplo, gamma 14-3-3. En otra realización, el epítipo eta 14-3-3 es único para eta 14-3-3.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una transferencia western de eta 14-3-3 recombinante utilizando dilución serial de suero de un paciente diagnosticado con artritis reumatoide (Muestra 3323).

La Figura 2 muestra una transferencia western de eta 14-3-3 recombinante utilizando dilución serial de suero de un paciente diagnosticado con artritis reumatoide (Muestra 3365).

La Figura 3 muestra una transferencia western de eta 14-3-3 recombinante utilizando dilución serial de suero de un paciente no diagnosticado con artritis reumatoide (Muestra 40).

La Figura 4 muestra una transferencia western de eta 14-3-3 recombinante utilizando dilución serial de suero de un paciente no diagnosticado con artritis reumatoide (Muestra 39).

Descripción detallada

“Sujeto” y “paciente” se utilizan de manera intercambiable y se refieren a, excepto cuando se indique, mamíferos tales como humanos y primates no humanos, así como conejos, ratas, ratones, cabras, cerdos y otras especies de mamíferos.

La “afección artrítica”, “artritis” y “artralgia” se utilizan de manera intercambiable, y generalmente se refieren a, excepto cuando se indica, un trastorno inflamatorio de las articulaciones del cuerpo. El dolor, hinchazón, rigidez y dificultad para moverse se asocian frecuentemente con afecciones artríticas. La artritis se compone de más de 100 condiciones diferentes. Pueden ser desde formas relativamente leves hasta formas sistémicas paralizantes, véase, por ejemplo, www.arthritis.ca/types%20of%20arthritis/default.asp?s=1. Una afección artrítica se puede deber a cualquiera de varias causas, que incluyen infecciones, traumatismos, trastornos degenerativos, trastornos o alteraciones metabólicas u otras etiologías desconocidas. Una afección artrítica se puede describir más específicamente de acuerdo con el subtipo, por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedad mixta del tejido conjuntivo

(MCTD), artritis inducida por cristales, artritis reactiva, espondiloartropatía, artrosis, sarcoidosis, reumatismo palindrómico, artritis post traumática, artritis relacionada con tumores malignos, artritis séptica, artritis de Lyme, artrosis, bacteriana, artritis infecciosa, etc. La artritis puede acompañar otros trastornos identificados, que incluye gota, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, etc. Una afección artrítica bien definida se refiere al conocimiento sobre el tipo de artritis y su etapa, por ejemplo, inicio, remisión, recaída, etc.

Los "autoanticuerpos" son anticuerpos endógenos que se unen específicamente a los antígenos propios, es decir, un componente de tejido normal. Un autoanticuerpo se produce en respuesta a un antígeno natural del mismo cuerpo que produce el autoanticuerpo.

La "unión inmunológica" y la "formación de un complejo inmunitario" se utilizan de manera intercambiable y, como se utiliza en este contexto, generalmente se refieren a las interacciones no covalentes del tipo que ocurren entre un anticuerpo, por ejemplo, un autoanticuerpo y un antígeno para el cual el anticuerpo es específico. La fuerza o afinidad de las interacciones de unión inmunológica se pueden expresar en términos de la constante de disociación (K_d) de la interacción, en la que una K_d más pequeña representa una afinidad mayor. Las propiedades de unión inmunológica se pueden cuantificar utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, véase Davies et al. (1990) Rev. Anual Biochem. 59:439-473. Se dice que un anticuerpo, o fragmento del mismo de unión a antígeno, se "une específicamente", "se une inmunológicamente" y/o es "inmunológicamente reactivo" si reacciona a un nivel detectable (dentro, por ejemplo, de un ensayo ELISA) con un ligando, y no reacciona de forma detectable con ligandos no relacionados bajo condiciones similares.

"Anticuerpo" se refiere a una composición que comprende una proteína que se une específicamente a un antígeno correspondiente y tiene una estructura general común de inmunoglobulinas. El término anticuerpo cubre específicamente anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada. Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos o derivados de otras especies. Normalmente, un anticuerpo comprenderá por lo menos dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras interconectadas por enlaces disulfuro, que cuando se combinan forman un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada (CH). La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3, y puede ser del isotipo mu, delta, gamma, alfa o épsilon. De manera similar, la cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera (CL). La región constante de cadena ligera comprende un dominio, CL, que puede ser del isotipo kappa o lambda. Las regiones VH y VL se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del anfitrión, que incluyen varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. La región constante de cadena pesada media la unión de la inmunoglobulina al tejido del anfitrión o factores del anfitrión, particularmente a través de receptores celulares tales como los receptores Fc (por ejemplo, FcγRI, FcγRII, FcγRIII, etc.). Como se utiliza en este documento, el anticuerpo también incluye una porción de unión a antígeno de una inmunoglobulina que retiene la capacidad de unirse al antígeno. Estos incluyen, como ejemplos, F(ab), un fragmento monovalente de dominios de anticuerpos VL CL y VH CH; y el fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra. El término anticuerpo también se refiere a fragmentos Fv de una sola cadena recombinantes (scFv) y moléculas biespecíficas tales como, por ejemplo, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos No. 5,844,094).

El "antígeno" se debe interpretar de manera amplia y se refiere a cualquier molécula, composición o partícula que pueda unirse específicamente a un anticuerpo. Un antígeno puede tener uno o más epítopos que interactúan con el anticuerpo, aunque no necesariamente induce la producción de ese anticuerpo.

De acuerdo con lo anterior, los términos "autoanticuerpos contra 14-3-3" y "autoanticuerpos con 14-3-3" se utilizan indistintamente y se refieren a anticuerpos endógenos producidos por un sujeto mamífero que se une específicamente a una proteína 14-3-3 o un fragmento de la misma de dicho anfitrión.

"14-3-3" y "proteína 14-3-3" se utilizan de manera intercambiable y se refieren a por lo menos un miembro de la familia 14-3-3 de moléculas reguladoras intracelulares conservadas que se expresan de forma ubicua en eucariotas. Las proteínas 14-3-3 tienen la capacidad de unirse a una multitud de proteínas de señalización funcionalmente diversas, que incluyen quinasas, fosfatasa y receptores de transmembrana. De hecho, más de 100 proteínas de señalización han sido reportadas como ligandos 14-3-3. Las proteínas 14-3-3 se pueden considerar miembros evolucionados de la superfamilia de Repetición de Péptidos Tetrátricos. Generalmente tienen 9 o 10 hélices alfa, y forman en general interacciones homo y/o heterodímero a lo largo de sus hélices amino terminales. Estas proteínas contienen una serie de dominios conocidos, que incluyen regiones para la interacción de cationes divalentes,

fosforilación y acetilación y división proteolítica, entre otros. Hay siete isoformas distintas codificadas genéticamente de las proteínas 14-3-3 que se sabe que se expresan en mamíferos, con cada isoforma que comprende entre 242-255 aminoácidos. Las siete isoformas de la proteína 14-3-3 se designan como α/β (alfa/beta)14-3-3, (δ/ζ) δ/ζ 14-3-3, ϵ (épsilon) 14-3-3, γ (gamma) 14-3-3, η (eta) 14-3-3, τ/θ (tau/theta) 14-3-3 y σ (sigma/estratífina) 14-3-3. Las proteínas 14-3-3 tienen un alto grado de similitud de secuencia, y se sabe que se someten a un procesamiento posterior a la traducción, por ejemplo, fosforilación, citrulinación, etc. Véase, por ejemplo, Megidish et al. (1998) J. Biol. Chem. 273: 21834-45. En consecuencia, los autoanticuerpos anti-14-3-3 pueden unirse específicamente y/o reconocer más de una isoforma de la proteína 14-3-3, o pueden unirse y/o reconocer específicamente una sola isoforma (por ejemplo, eta 14-3-3). Adicionalmente, los anticuerpos anti-14-3-3 pueden unirse y/o reconocer una proteína 14-3-3 que se ha modificado, por ejemplo, por procesos naturales (por ejemplo, post-traduccionales) o químicos.

Los términos “unión específica” o “unir específicamente” cuando se utilizan en referencia a la interacción de un anticuerpo y una proteína o péptido significa que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (es decir, un epítipo) sobre la proteína; en otras palabras, el anticuerpo es reconocer y unirse a una estructura de proteína específica en lugar de a proteínas en general.

Los epítipos son características químicas generalmente presentes sobre las superficies de las moléculas y accesibles a la interacción con un anticuerpo. Las características químicas típicas son fracciones de aminoácidos y de azúcar, que tienen características estructurales tridimensionales, así como propiedades químicas que incluyen carga, hidrofiliidad y lipofiliidad. Los epítipos conformacionales se distinguen de los epítipos no conformacionales por la pérdida de reactividad con un anticuerpo después de un cambio en los elementos espaciales de la molécula sin ningún cambio en la estructura química subyacente. De acuerdo con lo anterior, el término “epítipo” cuando se utiliza en referencia a proteínas 14-3-3 o isómeros específicos generalmente se refiere a un determinante de la proteína, que incluye una proteína 14-3-3 modificada, que es capaz de unirse a un anticuerpo, por ejemplo, un autoanticuerpo. En este documento se describen los epítipos 14-3-3 que se reconocen por los autoanticuerpos en un paciente diagnosticado con artritis, en particular artritis reumatoide, los métodos para utilizar dichos epítipos para evaluar y/o caracterizar una afección artrítica en un sujeto, y los kits que comprenden dichos epítipos.

La proteína 14-3-3 o fragmento de la misma puede comprender un epítipo compartido entre una pluralidad de isoformas de proteína 14-3-3, o puede comprender un epítipo único para uno o un subconjunto de isoformas de proteína 14-3-3. “Compartido” como se utiliza en este documento se refiere a un fragmento o epítipo en común entre dos o más isoformas de proteína 14-3-3. En realizaciones preferidas, la proteína 14-3-3 o fragmento de la misma comprende un epítipo eta y/o gamma 14-3-3. En una realización, la proteína 14-3-3 o fragmento de la misma comprende un epítipo eta 14-3-3 compartido por al menos otra isoforma 14-3-3, por ejemplo, gamma 14-3-3. En otra realización, el epítipo eta 14-3-3 es único para eta 14-3-3. Los epítipos comúnmente reconocidos para eta 14-3-3 se incluyen en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Epítipos Eta 14-3-3

SEQ ID NO:1	93-107	hélice	LETVCNDVLSLLDKF
SEQ ID NO:2	191-199	Hélice	EQACLLAKQ
SEQ ID NO:3	144-155	Hélice	NSVVEASEAAYK
SEQ ID NO:4	144-152	Hélice	NSVVEASEA
SEQ ID NO:5	147-155	Hélice	VEASEAAYK
SEQ ID NO:6	163-170	Hélice	EQMQPHTP
SEQ ID NO:7	168-177	Hélice	THPIRLGLAL
SEQ ID NO:8	82-92	Hélice	VKAYTEKIEKE
SEQ ID NO:9	68-79	Hélice	QKTMAOGNEKKL
SEQ ID NO:10	138-146	Hélice	ASGEKKNSV
SEQ ID NO:11	69-77	bucle	KTMADGNEK
SEQ ID NO:12	32-40	Bucle	ELNEPLSNE
SEQ ID NO:13	103-117	Bucle	LLOKFLIKNCNDFQY
SEQ ID NO:14	130-143	Bucle	YYRYLAEVASGEKK

ES 2 714 216 T3

SEQ ID NO:	Rango	Estructura	Secuencia
SEQ ID NO:15	184-194	Bucle	YEIQNAPEQAC
SEQ ID NO:16	206-218	Bucle	AELDTLNEDSYKD
SEQ ID NO:17	44-57	sin hélice	LLSVAYKNVVGARR
SEQ ID NO:18	15-23	sin hélice	EQAERYDDM
SEQ ID NO:19	130-138	sin hélice	YYRYLAEVA
SEQ ID NO:20	118-125	sin hélice	ESKVFYLK
SEQ ID NO:21	210-218	sin hélice	TLNEDSYKD
SEQ ID NO:22	77-84	sin hélice	KKLEKVKA
SEQ ID NO:23	76-86	sin hélice	EKKLRKVKAYR
SEQ ID NO:24	142-158	sin hélice	KKNSVVEASEAAYKEAF
SEQ ID NO:25	105-120	sin hélice	DKFLIKNCNDFQYESK
SEQ ID NO:26	237-246	sin hélice	QQDEEAGEGN
SEQ ID NO:27	75-82	sin hélice	NEKKLEKVK
SEQ ID NO:28	104-116	sin hélice	LDKFLIKNCNDFQ
SEQ ID NO:29	141-146	sin hélice	EKKNSV
SEQ ID NO:30	104-115	sin hélice	LDKFLIKNSCNDF
SEQ ID NO:31	77-86	sin hélice	KKLEKVKAYR
SEQ ID NO:32	143-157	sin hélice	KNSVVEASEAAYKEA
SEQ ID NO:33	1-12	sin hélice	DREQLLQRARLA

Métodos de diagnóstico, pronóstico y terapéuticos, y monitorización del tratamiento

En general, la presencia o ausencia de una afección artrítica, o pronóstico de paciente, se puede determinar al:

- 5 a) proporcionar una muestra de un sujeto mamífero del que se sospecha tiene una afección artrítica; b) detectar en dicha muestra la presencia de un autoanticuerpo contra por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítopo eta 14-3-3; en el que la presencia de dicho autoanticuerpo es indicativa de una afección artrítica que implica dicho autoanticuerpo en el sujeto

en el que la etapa de detección comprende poner en contacto la muestra biológica con por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítopo eta 14-3-3,

- 10 en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste de sangre, fluido sinovial, plasma, suero o tejido.

En general, la presencia o ausencia de una afección artrítica, o pronóstico de paciente, se puede determinar al:

- 15 a) proporcionar una muestra de un sujeto mamífero del que se sospecha tiene una afección artrítica; b) detectar en dicha muestra la presencia de un complejo inmunitario que comprende i) un autoanticuerpo contra por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítopo eta 14-3-3 y ii) por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítopo eta 14-3-3;

en el que la presencia de dicho complejo inmunitario es indicativa de una afección artrítica que implica dicho autoanticuerpo en el sujeto en el que la etapa de detección comprende poner en contacto la muestra biológica con una molécula de unión unida a un soporte sólido para la detección de dicho complejo inmunitario

en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste de sangre, fluido sinovial, plasma, suero o tejido.

Los métodos comprenden utilizar por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta 14-3-3 para detectar autoanticuerpos contra la proteína. Existe una variedad de formatos de ensayo conocidos por aquellos expertos en la técnica para utilizar una proteína para detectar anticuerpos en una muestra. Véase, por ejemplo, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Como ejemplos no limitantes, la detección de autoanticuerpos contra 14-3-3 se puede realizar utilizando métodos o ensayos bien conocidos, por ejemplo. inmunoprecipitación, ELISA, análisis de transferencia Western, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, inmunoensayos "intercalados", ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitación por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos in situ, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos de proteína A, ensayos de inmunoelectroforesis análisis de clasificación de células activadas (FACS), radioinmunoensayo, prueba de tira, prueba en el punto de cuidado y similares. El experto habitual en la técnica reconocerá que estos métodos también se pueden utilizar para medir el nivel de autoanticuerpos contra, o complejos inmunitarios con, proteínas eta 14-3-3 en la muestra biológica. En algunas realizaciones, se utiliza un ensayo de detección automatizado. Los métodos para la automatización de inmunoensayos incluyen aquellos descritos en las patentes de EE.UU. 5,885,530, 4,981,785, 6,159,750, y 5,358,691.

En algunas realizaciones, el análisis y la presentación de los resultados también son automatizados. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se utiliza un software que genera un pronóstico basado en la presencia o ausencia de una serie de proteínas correspondientes a afecciones artríticas, que incluyen las proteínas 14-3-3.

En una realización, los ensayos implican el uso de por lo menos una proteína eta 14-3-3 o un fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta 14-3-3 inmovilizado sobre un soporte sólido para unirse y capturar autoanticuerpos que se unen específicamente a la(s) proteína(s) eta 14-3-3 del resto de la muestra. Los autoanticuerpos unidos se pueden luego detectar utilizando un reactivo de detección que contiene un grupo indicador y se une específicamente al complejo anticuerpo/proteína. Dichos reactivos de detección pueden comprender, por ejemplo, un agente de unión que se une específicamente al autoanticuerpo tal como un anticuerpo antihumano.

El soporte sólido puede ser cualquier material conocido por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser un pozo de prueba en una placa de microtitulación o una nitrocelulosa u otra membrana adecuada. Alternativamente, el soporte puede ser una perla o disco, tal como vidrio, fibra de vidrio, látex o un material plástico tal como poliestireno o cloruro de polivinilo. El soporte también puede ser una partícula magnética o un sensor de fibra óptica, tales como aquellos descritos, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. No. 5,359,681. La proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta se puede inmovilizar sobre el soporte sólido utilizando una variedad de técnicas conocidas por aquellos expertos en la técnica, que se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica. En el contexto de la presente invención, el término "inmovilización" se refiere tanto a la asociación no covalente, como la adsorción, y la unión covalente (que puede ser un enlace directo entre el anticuerpo y los grupos funcionales sobre el soporte o puede ser un enlace por medio de un agente de entrecruzamiento). Se prefiere la inmovilización por adsorción en un pozo en una placa de microtitulación o en una membrana. En dichos casos, la adsorción se puede lograr al poner en contacto el anticuerpo, en un tampón adecuado, con el soporte sólido durante un tiempo adecuado. El tiempo de contacto varía con la temperatura, pero por lo general se encuentra entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 1 día. En una realización, una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina se utiliza junto con una proteína eta 14-3-3 biotinilada o un fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta.

La unión covalente de la proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta a un soporte sólido generalmente se puede lograr al hacer reaccionar primero el soporte con un reactivo bifuncional que reaccionará tanto con el soporte como con la proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma. El autoanticuerpo capturado luego se puede detectar utilizando la técnica "intercalada" no competitiva en la que el ligando marcado para el autoanticuerpo se expone a la fase sólida lavada. Alternativamente, los formatos competitivos se basan en la introducción previa de un anticuerpo marcado para la muestra, de modo que las formas marcadas y no marcadas compitan por la unión a la fase sólida. Dichas técnicas de ensayo son bien conocidas y están bien descritas tanto en la bibliografía de patentes como en la científica. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 3,791, 932; 3,817,837; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; y 4,098,876. Los métodos de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) se describen en detalle en la patente de EE.UU. Nos. 3,791,932; 3,839.153; 3,850.752; 3,879.262; y 4.034.074. Los ensayos ELISA detectan títulos muy bajos de autoanticuerpos.

Los autoanticuerpos también se pueden detectar mediante radioinmunoensayo en fase sólida (RIA). La fase sólida se expone a la muestra de suero en presencia de anticuerpos radiomarcados que compiten por la unión al ligando inmovilizado. En este ensayo, la cantidad de radiomarcador unido a la fase sólida está inversamente relacionada con la cantidad de autoanticuerpos inicialmente presentes en la muestra de suero. Después de la separación de la fase sólida, la radiomarcación unida no específicamente se elimina mediante al lavar, y se determina la cantidad de radiomarcado unida a la fase sólida. La cantidad de radiomarcador unido está, a su vez, relacionada con la cantidad de autoanticuerpos inicialmente presentes en la muestra.

En una realización, el ensayo se realiza en un formato de prueba de flujo o de tira, en el que la proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítopo eta 14-3-3 se inmoviliza sobre una membrana, tal como nitrocelulosa. En la prueba de flujo, los autoanticuerpos para proteínas eta 14-3-3 dentro de la muestra se unen a la proteína eta 14-3-3 inmovilizada o un fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítopo eta 14-3-3 cuando la muestra contacta con la membrana. Un segundo agente de unión marcado se une al complejo inmunitario cuando una solución que contiene el segundo agente de unión entra en contacto con la membrana. La detección del segundo agente de unión unido se puede realizar entonces como se describió anteriormente. En el formato de prueba de tira, un extremo de la membrana al que se une la proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítopo eta 14-3-3 se sumerge en una solución que contiene la muestra. La muestra migra a lo largo de la membrana a través de una región que contiene un segundo agente de unión, por ejemplo, a los autoanticuerpos, y al área de la proteína eta 14-3-3 inmovilizada o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítopo eta 14-3-3. La concentración del segundo agente de unión en el área de la proteína eta 14-3-3 inmovilizada o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítopo eta 14-3-3 indica la presencia de una afección artrítica, o pronóstico del paciente, etc. Normalmente, la concentración del segundo agente de unión en ese sitio genera un patrón, tal como una línea, que se puede leer visualmente. La ausencia de dicho patrón indica un resultado negativo. En general, la cantidad de agente de unión inmovilizado sobre la membrana se selecciona para generar un patrón visualmente discernible cuando la muestra biológica contiene un nivel del autoanticuerpo que sería suficiente para generar una señal positiva en el ensayo, en el formato discutido anteriormente. Los agentes de unión preferidos para uso en dichos ensayos son las proteínas eta 14-3-3 y fragmentos de las mismas que comprenden por lo menos un epítopo eta 14-3-3. Dichas pruebas se pueden realizar normalmente con una cantidad muy pequeña de muestra biológica y en el punto de atención, que también puede ser cuantificable.

Además de detectar la presencia de autoanticuerpos en una muestra, se pueden utilizar muchos métodos para medir cuantitativamente los niveles de los autoanticuerpos. En algunos métodos, el antígeno reacciona con el autoanticuerpo en una fase líquida, y los autoanticuerpos se miden cuantitativamente mediante una técnica de inmunoprecipitación. Por ejemplo, una proteína eta 14-3-3 o un fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítopo eta 14-3-3 (es decir, un isómero de longitud completa o fragmentos antigénicos) puede marcarse de forma detectable (por ejemplo, con un isótopo o una enzima). Los polipéptidos se pueden marcar durante la síntesis (por ejemplo, al agregar ³⁵S-metionina a un sistema de traducción in vitro o sistema de expresión celular) o después de la síntesis. El antígeno detectable se agrega directamente a una muestra biológica líquida (por ejemplo, un suero) para formar complejos inmunitarios. Los complejos inmunitarios se pueden precipitar con polietilenglicol. Los complejos inmunitarios también se pueden aislar con un anticuerpo secundario (por ejemplo, inmunoglobulina antihumana de cabra) u otro tipo de moléculas de unión (por ejemplo, proteína A o proteína G) que se une a un soporte sólido (por ejemplo, perlas de agarosa o sefarosa). Los inmunoprecipitados se lavan varias veces después de separarse de la muestra líquida y se examinan para determinar la intensidad de la marca detectable (por ejemplo, radioactividad). Cualquier autoanticuerpo presente en la muestra de esta manera se puede detectar y cuantificar. Opcionalmente, también se puede agregar un polipéptido no marcado para competir con el polipéptido marcado para unión a autoanticuerpos.

Los métodos de diagnóstico de la presente invención también se dirigen a detectar en un sujeto, complejos inmunitarios en circulación formados entre proteínas 14-3-3 y un autoanticuerpo. Los métodos discutidos anteriormente se pueden modificar fácilmente para la detección de dichos complejos inmunitarios. Por ejemplo, se puede agregar una molécula de unión inmovilizada (por ejemplo, proteína A o proteína G unida a una perla) a una muestra biológica líquida. Después de la separación de la fase líquida, los complejos inmunitarios capturados por las moléculas de unión se pueden analizar con SDS-PAGE y sondear con diversos anticuerpos contra proteínas 14-3-3. Los antígenos capturados también se pueden someter a un análisis directo de la secuencia de aminoácidos. La identidad de los complejos inmunitarios puede de esta manera ser revelada. Se practican rutinariamente varios ensayos para detectar complejos inmunitarios en circulación en un sujeto, por ejemplo, como se describe en Tomimori-Yamashita et al., *Lepr Rev*, 70 (3): 261-71, 1999 (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas con base en anticuerpo); Krapf et al., *J Clin Lab Immunol*, 21 (4): 183-7, 1986 (ensayo de inmunoabsorción ligado a fluorescencia); Kazeem et al., *East Afr Med J*, 67 (6): 396-403, 1990 (inmunonefelometría láser); y Rodrick et al., *J Clin Lab Immunol*, 7 (3): 193-8, 1982 (ensayo de filtro de fibra de vidrio de proteína A, PA-GFF y ensayo de insolubilización de polietilenglicol). Cada uno de estos ensayos bien conocidos se puede emplear para detectar complejos inmunitarios en circulación para los métodos de la presente invención.

Para mejorar la sensibilidad clínica, se pueden ensayar múltiples marcadores dentro de una muestra dada. En particular, uno o más marcadores de artritis, o indicadores de pronóstico, etc., se pueden ensayar en combinación con autoanticuerpos para la proteína 14-3-3. Estos otros marcadores pueden ser proteínas o ácidos nucleicos. En una realización preferida, uno o más de los otros marcadores son proteínas MMP o ácidos nucleicos u otros factores que se utilizan comúnmente como indicadores para la artritis, por ejemplo, anti-CCP, CRP, SAA, IL-6, SIOO, osteopontina, RF, MMP-I, MMP-3, ácido hialurónico, sCD14, marcadores de angiogénesis y productos del metabolismo del hueso, cartílago o sinovio (por ejemplo, CTX-I y CTX-II), etc. Los métodos para aislar y ensayar ácidos nucleicos basados en secuencias de referencia son bien conocidos en la técnica, ya que son métodos para detectar proteínas de interés dentro de una muestra de paciente.

Los ensayos de combinación se pueden realizar de forma concurrente o secuencial. La selección de marcadores puede basarse en experimentos de rutina para determinar combinaciones que resulten en una sensibilidad óptima.

En una realización, la invención proporciona métodos para diagnosticar una afección artrítica. En general, una afección artrítica se puede detectar en un paciente con base en la presencia de autoanticuerpos para eta 14-3-3 en el fluido sinovial, articulación sinovial, sangre, plasma, o suero de un paciente. En otras palabras, los autoanticuerpos para la proteína eta 14-3-3 se pueden utilizar como un marcador para indicar artritis. Adicionalmente, la presencia de autoanticuerpos para eta 14-3-3, o los niveles relativos de autoanticuerpos para eta 14-3-3, según se determinan a través del uso de una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta 14-3-3 pueden ser un indicador pronóstico de artritis en etapa temprana, antes de que progrese a una forma debilitante. Una ventaja del pronóstico o diagnóstico temprano es la implementación temprana de un régimen de tratamiento.

Para determinar la presencia o ausencia de una afección artrítica en un sujeto, el nivel de autoanticuerpos contra, o complejos inmunitarios con, eta 14-3-3 en una muestra biológica del sujeto generalmente se puede comparar con un nivel de complejos de autoanticuerpos/ inmunitarios correspondientes a un control normal. En una realización preferida, el control normal se establece a partir del nivel medio promedio de autoanticuerpos contra, o complejos inmunitarios con, 14-3-3 en muestras de pacientes sin artritis. En una realización alternativa, el valor de control normal se puede determinar utilizando una curva de operador de receptor, por ejemplo, véase el método de Sackett et al., *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, Little Brown and Co., 1985, p. 106-7. Brevemente, en esta realización, el valor de control se puede determinar a partir de un gráfico de pares de tasas de verdaderos positivos (es decir, sensibilidad) y de tasas de falsos positivos (100% de especificidad) que corresponden a cada posible valor de corte para el resultado de la prueba de diagnóstico. El valor de control en el gráfico que está más cerca de la esquina superior izquierda (es decir, el valor que encierra el área más grande) proporciona el valor más preciso y una muestra que genera una señal que es más alta que el valor determinado por este método se puede considerar positiva. Alternativamente, el valor de control puede desplazarse hacia la izquierda a lo largo de la gráfica, para minimizar la tasa de falsos positivos, o hacia la derecha, para minimizar la tasa de falsos negativos. En general, una muestra que genera una señal que es más alta que el valor de control determinado por este método se considera positiva para la artritis.

La invención puede ser útil en un método para determinar el subtipo de artritis en un paciente mamífero, que comprende (a) proporcionar una primera muestra de un sujeto mamífero del que se sospecha tiene una afección artrítica, (b) detectar la presencia de un autoanticuerpo contra, o un complejo inmunitario con, por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta 14-3-3 en dicha muestra, (c) medir la cantidad de dicho complejo de autoanticuerpo o inmunitario y compararlo contra la cantidad de autoanticuerpos contra, o complejos inmunitarios con, por lo menos una dicha proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta 14-3-3 en una segunda muestra biológica de un segundo sujeto cuyo subtipo de artritis es conocido y/o previamente establecido, en la que dicha comparación determina el subtipo de artritis para el primer sujeto.

Se describen en este documento métodos para determinar la respuesta potencial de un paciente a un tratamiento dirigido a la artritis. En una realización, los métodos implican determinar el nivel de autoanticuerpos contra, o complejos inmunitarios con, por lo menos una proteína 14-3-3 o fragmento de la misma en una muestra de paciente. En una realización preferida, se conoce el nivel de autoanticuerpos para/complejos inmunitarios con 14-3-3 en la muestra del paciente se compara con el de las muestras de sujetos cuya capacidad para responder al tratamiento. Un nivel relativamente alto de autoanticuerpos contra/complejos inmunitarios con 14-3-3 en una primera muestra de paciente en comparación con una muestra de un sujeto no inflamatorio y/o una muestra de otro paciente inflamatorio puede indicar que el primer paciente es un candidato preferido para un tratamiento bien conocido, por ejemplo, una terapia con un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (DMARD), tal como anti-TNF, metotrexato, minociclina, hidroxicloroquina, sulfasalazina, azatioprina, anti-IL-1, anti-IL-6r y me similares. A la inversa, un nivel relativamente bajo de complejos de autoanticuerpos/ inmunitarios a 14-3-3 en una primera muestra de paciente, en comparación con una muestra de otro paciente inflamatorio, puede indicar que el primer paciente no es un candidato preferido para un tratamiento bien conocido, especialmente si el nivel es más cercano a aquel de una muestra de un sujeto no inflamatorio.

Los regímenes de tratamiento para diversos tipos de artritis son conocidos en la técnica. Por ejemplo, a un paciente diagnosticado con artritis reumatoide se le pueden recetar medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) inicialmente, para aliviar el malestar y reducir la inflamación. Otros regímenes de tratamiento pueden incluir, por ejemplo, medicamentos antiinflamatorios esteroideos (SAID, por ejemplo, cortisol, prednisona), inhibidores específicos de la ciclooxigenasa 2 (CSI), glucocorticoides y/o fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad estándar (DMARD) tales como, por ejemplo, agentes neutralizantes anti-TNF-alfa, fármacos inmunosupresores (por ejemplo, ciclosporina, azatioprina, ciclofosfamida), antibióticos, antimaláricos y fármacos citotóxicos (por ejemplo, metotrexato, sulfasalazina, leflunomida). Los regímenes de tratamiento también pueden incluir ventajosamente aquellos que se dirigen directamente a las proteínas 14-3-3, véase, por ejemplo, el documento PCT/CA2008/002154. Aquellos expertos en la técnica conocerán detalles sobre la dosificación o ejemplos de fármacos particulares, y se pueden encontrar en, por ejemplo, Harrison's Principles of Internal Medicine 15th ed. BRAUNWALD et al eds. McGraw-Hill o "The Pharmacological basis of therapeutics", 10th edition. 5

HARDMAN HG., LIMBIRD LE. editors. McGraw-Hill, New York, y en "Clinical Oncology", 3rd edition. Churchill Livingstone/ Elsevier Press, 2004. ABELOFF, MD. editor.

5 La invención puede ser útil para monitorizar tratamiento de artritis. En una realización, los métodos implican medir la cantidad de dicho complejo de autoanticuerpo o inmunitario y compararlo contra la cantidad de complejo de autoanticuerpo o inmunitario en una muestra previa del mismo sujeto en el que el nivel relativo de dicho autoanticuerpo contra, o un complejo inmunitario con, por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma en dicha muestra en comparación con la muestra previa del mismo sujeto es indicativo de la eficacia de un régimen terapéutico.

10 La presencia o niveles relativos de autoanticuerpos para/complejos inmunitarios con eta 14-3-3 se puede correlacionar con la presencia o niveles relativos de otras proteínas conocidas por estar asociadas con condiciones artríticas en pacientes. Ejemplos no limitantes de proteínas bien conocidas por estar asociadas con una afección artrítica incluyen citoquinas inflamatorias, tales como factor de necrosis de tumor, proteína 14-3-3, y matriz de metaloproteinasas (MMPs), tales como MMP-1 o MMP-3, etc. Por lo menos se han identificado 25 diferentes MMPs. La detección de autoanticuerpos para 14-3-3 en combinación con la detección de por lo menos una citoquina inflamatoria y/o MMP en una muestra de paciente se puede utilizar para diagnosticar artritis. Adicionalmente, la presencia o niveles relativos de complejos de autoanticuerpos/inmunitarios para eta 14-3-3 en combinación con por lo menos una isoforma 14-3-3, por lo menos una MMP y/o por lo menos una citoquina inflamatoria en una muestra de paciente se puede utilizar como un indicador pronóstico de artritis en etapa temprana, antes de que la artritis progrese a una forma debilitante.

20 También se describe en este documento el uso de kits para evaluar una afección artrítica. Dichos kits para detectar la presencia en una muestra de un autoanticuerpo para por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta 14-3-3, para uso en evaluar una afección artrítica en un sujeto mamífero, comprenden por lo menos una dicha proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta 14-3-3 y un reactivo secundario, en el que el reactivo secundario se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo secundario marcado, un reactivo cromogénico o fluourogénico, y un agente de polimerización.

25 Un kit anterior normalmente comprende dos o más componentes necesarios para realizar un análisis de diagnóstico y/o pronóstico. Los componentes pueden ser compuestos, reactivos, contenedores, instrucciones y/o equipos. Por ejemplo, un contenedor dentro de un kit puede contener una proteína eta 14-3-3 o un fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta. Dichos kits también pueden contener un reactivo de detección como se describió anteriormente que contiene un grupo informador adecuado para la detección directa o indirecta de la unión del anticuerpo.

30 De acuerdo con lo anterior, en el presente documento se describen el uso de kits para detectar la presencia de autoanticuerpos para/complejos inmunitarios con eta 14-3-3 y opcionalmente otros marcadores, por ejemplo, MMP, en una muestra de paciente, el kit es útil para proporcionar un resultado de diagnóstico o pronóstico adecuado para diagnosticar o diferenciar diversas afecciones artríticas. Indicaciones adicionales en las que puede estar implicada la presencia de proteínas eta 14-3-3 y/o autoanticuerpos también incluyen, por ejemplo, trastornos cardiovasculares y/o neurodegenerativos. Un kit puede comprender una proteína eta 14-3-3 o un fragmento de la misma, que puede estar opcionalmente marcado, por ejemplo, con una marca radioactiva, una marca luminiscente, una marca fluorescente, una enzima, etc. Los métodos para marcar de forma detectable proteínas son bien conocidos en la técnica. Dicho kit puede incluir además reactivos de detección específicos para otros marcadores de artritis, por ejemplo, anti-CCP, anti-RF, CRP, SAA, IL-6, SIOO, osteopontina, RF, MMP-I, MMP-3, ácido hialurónico, sCD14, marcadores de angiogénesis y productos del metabolismo óseo, cartilaginosa o sinovial (por ejemplo, CTX-1 y CTX-II), etc. El kit incluye adicionalmente anticuerpos secundarios marcados (por ejemplo, anticuerpos anti-humanos) El kit también pueden incluir reactivos cromogénicos o fluourogénicos, agentes de polimerización y similares. Las instrucciones para utilizar el kit con fines de diagnóstico o pronóstico, incluidos los estándares de comparación apropiados para cuantificar y/o evaluar el nivel de dichos autoanticuerpos en el contexto de un estado de enfermedad particular, también se pueden proporcionar ventajosamente en forma impresa y/o registrarse en un medio adecuado.

Experimentos

50 Ejemplo 1: Detección de eta 14-3-3 recombinante con suero humano

Se cargó una proteína eta 14-3-3 recombinante (Augurex, North Vancouver, BC, Canadá) sobre un gel de SDS-PAGE y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Los sueros humanos de sujetos no diagnosticados con artritis reumatoide (Biochemed, Winchester, VA) o sujetos diagnosticados con artritis reumatoide (Biochemed, Suffolk County, NY) se incubaron con la membrana para detectar y caracterizar autoanticuerpos para eta 14-3-3 en sueros. Los autoanticuerpos se detectaron utilizando un anticuerpo secundario antihumano conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) y se visualizaron mediante quimioluminiscencia.

En particular, se cargaron 2 µg de proteína eta 14-3-3 recombinante en tampón de muestra (Tris ácido 62.5 mM, SDS al 2%, glicerol al 10%, azul de bromofenol al 0.01%, β-mercaptoetanol al 5%) sobre un gel de SDS-PAGE al

15%. El gel SDS-PAGE se ejecutó con tampón de funcionamiento (base Tris 2.5 mM, glicina 19.2 mM, SDS al 0.1%) a 70 voltios durante 30 minutos, luego 140 voltios hasta que el frente de tinte alcanzó el fondo del gel. La proteína se transfirió luego con tampón de transferencia (base Tris 2.5 mM, glicina 19.2 mM, metanol al 20%) sobre hielo durante 400 mAh a una membrana de nitrocelulosa. La eficiencia de transferencia se verificó utilizando el colorante Ponceau S para visualizar las proteínas sobre la membrana. Luego se colocaron las membranas en un tampón de bloqueo (leche seca sin grasa al % en TBS-T (Tris 10 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0.05%)) e incubado sobre agitador durante 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminó el tampón de bloqueo y se agregaron sueros humanos diluidos con tampón de bloqueo (1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, v/v) para cortar las membranas. Las membranas se incubaron en un agitador durante toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos cada una con TBS-T. Luego se agregó el anticuerpo HRP antihumano (0.1 µg/ml) en tampón de bloqueo y se incubó en un agitador durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron 6 veces durante 5 minutos cada una con TBS-T. Los autoanticuerpos se visualizaron utilizando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce, Rockford, Il) y se registraron sobre una película.

Los datos representativos presentados en las Figuras 1 y 2 demuestran que el suero humano tomado de pacientes con artritis posee anticuerpos que se dirigen hacia eta 14-3-3, como se evidencia por la visualización de eta 14-3-3 recombinante por análisis de inmunotransferencia.

La presencia de estos autoanticuerpos parece ser un fenómeno específico en afecciones inflamatorias como la artritis, ya que estos autoanticuerpos no fueron detectables o fueron detectables a niveles más bajos en el suero tomado de individuos sanos normales (Figuras 3 y 4).

Como parte del mecanismo de defensa natural, el sistema inmunológico genera anticuerpos como medio para destruir las partículas /patógenos extraños encontrados. En el caso de la artritis, está bien establecido que las proteínas 14-3-3, principalmente gamma y eta 14-3-3, son detectables en el líquido sinovial y el suero. Actualmente, se considera que los niveles de proteínas 14-3-3 y/o autoanticuerpos para proteínas 14-3-3 o fragmentos de las mismas en el líquido sinovial y el suero se correlacionan directamente con el daño en los tejidos de las articulaciones, y que dicha correlación se puede utilizar en los métodos descritos en este documento. Por ejemplo, un mayor nivel de autoanticuerpos para 14-3-3 puede llevar a una reducción en la proteína 14-3-3, y por lo tanto se correlaciona con un nivel más bajo o un riesgo de daño de tejido en las articulaciones.

Este estudio se realizó para determinar si el sistema inmunitario intenta contrarrestar o responder a la presencia de 14-3-3, al generar específicamente una respuesta de anticuerpos contra el objetivo y eliminándolos del suero. La presencia de estos autoanticuerpos proporcionaría evidencia adicional de que estas proteínas no existen normalmente en el espacio extracelular, ya que el cuerpo no generaría tal respuesta si estuvieran presentes normalmente.

Los datos demuestran claramente que, en el caso de la artritis, los autoanticuerpos dirigidos a 14-3-3 están presentes en niveles más altos en comparación con el suero de individuos sanos normales. De acuerdo con lo anterior, la expresión diferencial de estos anticuerpos en comparación con individuos sanos normales puede ser útil en términos de diagnóstico de artritis. Adicionalmente, la expresión diferencial puede tener utilidad en el pronóstico de la enfermedad, además de definir qué terapia administrar a un paciente, así como monitorizar la respuesta de un paciente a una terapia determinada.

Ejemplo 2: Desarrollo de un ensayo para medir los títulos o niveles de anticuerpos anti-14-3-3, con el fin de mapear los epítomos 14-3-3 más comúnmente reconocidos por los autoanticuerpos, los péptidos superpuestos de 15 residuos que representan la secuencia completa del péptido eta 14-3-3 se sintetizarán directamente sobre papel de celulosa utilizando la técnica de síntesis de manchas. Los residuos de cisteína se reemplazarán con serina con el fin de reducir las complicaciones químicas causadas por la presencia de cisteínas. Las membranas de celulosa modificadas con polietilenglicol y aminoácidos protegidos con Fmoc se comprarán de Abimed (Lagenfeld, Alemania). La matriz se definirá sobre la membrana mediante el acoplamiento de un separador de β-alanina y los péptidos se sintetizarán utilizando la química de acoplamiento DIC estándar (diisopropilcarbodiimida)/HOBt (hidroxibenzotriazol) como se describió anteriormente (Molina et al. (1996) Peptide Research 9: 151-155; Frank et al. (1992) Tetrahedron 48: 9217-9232).

Los aminoácidos activados se detectarán utilizando un robot Abimed ASP 222. Las etapas de lavado y desprotección se realizarán manualmente y los péptidos se acetilarán en el extremo N después del ciclo de síntesis final. Después de la síntesis de péptidos, la membrana se lavará en metanol durante 10 minutos y en un bloqueador (por ejemplo, TBST (solución salina tamponada con Tris con Tween al 0.1% (v/v). TM. 20) y 1% (p/v) de caseína). Después del lavado, la membrana se incubará con suero obtenido de un paciente diagnosticado con artritis reumatoide con agitación suave. Después de lavar con el bloqueador 3 veces, la membrana se incubará con un anticuerpo secundario marcado con HRP. La membrana se lavará tres veces durante 10 minutos cada una con bloqueador y 2 veces durante 10 minutos cada una con TBST. El anticuerpo unido se visualizará utilizando el reactivo SuperSignal™ West (Pierce) y una cámara digital (Alphananotech Fluoromager).

El mapeo de epítomos para un péptido 14-3-3 se realizará con suero de por lo menos tres pacientes diferentes, cada uno diagnosticado con artritis y confirmado con autoanticuerpos anti-14-3-3, para determinar los epítomos

comúnmente reconocidos. Adicionalmente, el mapeo de epítomos se puede realizar con otra, si no todas, las isoformas 14-3-3 para determinar si el epítomo comúnmente reconocido es específico de una isoforma, por ejemplo, eta 14-3-3, o compartido con uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis otras isoformas 14-3-3.

- 5 Los epítomos comúnmente reconocidos de por lo menos eta 14-3-3 se sintetizarán y se utilizarán para evaluar la especificidad de los epítomos para evaluar y/o caracterizar una afección artrítica, particularmente artritis reumatoide en comparación con otros subtipos artríticos y/o controles saludables. Después se establece la especificidad para evaluar y/o caracterizar una afección artrítica, el epítomo comúnmente reconocido se desarrollará en un ensayo cuantitativo que mide el nivel de los autoanticuerpos 14-3-3 en una muestra de paciente. El ensayo se puede utilizar para detectar y/o cuantificar los autoanticuerpos de la proteína 14-3-3 en una muestra de paciente.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para evaluar una afección artrítica en un sujeto mamífero, que comprende: a) proporcionar una muestra de un sujeto mamífero del que se sospecha tiene una afección artrítica; b) detectar en dicha muestra la presencia de un autoanticuerpo contra por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítopo eta 14-3-3;
- en el que la presencia de dicho autoanticuerpo es indicativa de una afección artrítica que implica dicho autoanticuerpo en el sujeto
- en el que la etapa de detección comprende poner en contacto la muestra biológica con por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítopo eta 14-3-3,
- 10 en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste de sangre, fluido sinovial, plasma, suero o tejido.
2. Un método para evaluar una afección artrítica en un sujeto mamífero, que comprende: a) proporcionar una muestra de un sujeto mamífero del que se sospecha tiene una afección artrítica; b) detectar en dicha muestra la presencia de un complejo inmunitario que comprende i) un autoanticuerpo contra por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítopo eta 14-3-3 y ii) por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítopo eta 14-3-3; en el que la presencia de dicho complejo inmunitario es indicativa de una afección artrítica que implica dicho autoanticuerpo en el sujeto
- 15 en el que la etapa de detección comprende poner en contacto la muestra biológica con una molécula de unión unida a un soporte sólido para la detección de dicho complejo inmunitario
- en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste de sangre, fluido sinovial, plasma, suero o tejido.
- 20 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que dicha etapa de detección comprende adicionalmente medir la cantidad de dicho complejo de autoanticuerpo o inmunitario y compararlo contra la cantidad de complejo de autoanticuerpo o inmunitario en una muestra de control, una muestra de control artrítica, o en una muestra previa del mismo sujeto.
- 25 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma se marca de forma detectable con una marca seleccionada del grupo que consiste de una marca radioactiva, una marca luminiscente, y una marca fluorescente, y una enzima.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, o reivindicaciones 3 y 4 cuando depende de la reivindicación 1, en el que la proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma se une a un soporte sólido.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5 en el que el autoanticuerpo se detecta mediante un ensayo ELISA.
- 30 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha detección ocurre mediante quimioluminiscencia.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que un nivel en aumento de dicho autoanticuerpo contra, o un complejo inmunitario con, por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítopo eta 14-3-3 en dicha muestra en comparación con la muestra de control normal es un indicador diagnóstico de artritis en dicho sujeto.
- 35 9. El método de acuerdo con la reivindicación 3, seleccionado de (i) métodos en los que un nivel relativo de dicho autoanticuerpo contra, o un complejo inmunitario con, por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítopo eta 14-3-3 en dicha muestra en comparación con la muestra de control artrítica es un indicador pronóstico de artritis en dicho sujeto, y (ii) métodos en los que el nivel relativo de dicho autoanticuerpo contra, o un complejo inmunitario con, por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma en dicha muestra en comparación con la muestra previa del mismo sujeto es indicativo de la eficacia de un régimen terapéutico.
- 40 10. Uso de un kit en el método de reivindicaciones 1-9 para detectar la presencia en una muestra de un autoanticuerpo para por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítopo eta 14-3-3, para uso en evaluar una afección artrítica en un sujeto mamífero, en el que el kit comprende por lo menos una dicha proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítopo eta 14-3-3 y un reactivo secundario, en el que el reactivo secundario se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo secundario marcado, un reactivo cromogénico o fluorogénico, y un agente de polimerización.
- 45 11. El uso de un kit de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicha por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítopo eta 14-3-3 se une a un soporte sólido.
- 50 12. El uso de un kit de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho por lo menos un epítopo eta 14-3-3 se comparte con por lo menos otra isoforma de proteína 14-3-3.

13. El uso de un kit de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicha otra isoforma de proteína 14-3-3 es gamma 14-3-3.
14. El uso de un kit de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho epítipo eta 14-3-3 es único para eta 14-3-3.
- 5 15. El uso de un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14 en el que el reactivo secundario es un anticuerpo secundario marcado para la detección de un autoanticuerpo para dicha proteína 14-3-3.
16. El uso de un kit de acuerdo con la reivindicación 15 en el que el anticuerpo secundario marcado es un anticuerpo antihumano.
- 10 17. El uso de por lo menos una proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta 14-3-3 para determinar el subtipo de artritis en un paciente mamífero que comprende (a) proporcionar una primera muestra de un sujeto mamífero del que se sospecha tiene una afección artrítica, (b) detectar la presencia de un autoanticuerpo contra, o un complejo inmunitario con, por lo menos una dicha proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta 14-3-3 en dicha muestra, (c) medir la cantidad de dicho complejo de autoanticuerpo o inmunitario y compararlo contra la cantidad de autoanticuerpos contra, o complejos inmunitarios con, por lo menos una de dicha proteína eta 14-3-3 o fragmento de la misma que comprende por lo menos un epítipo eta 14-3-3 en una segunda muestra biológica de un segundo sujeto cuyo subtipo de artritis es conocido y/o previamente establecido, en el que dicha comparación determina el subtipo de artritis para el primer sujeto.
- 15 18. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la detección de por lo menos un marcador de artritis adicional en dicha muestra biológica, en el que dicho por lo menos un marcador de artritis adicional se selecciona del grupo que consiste de proteína eta 14-3-3, matriz de metaloproteinasa-1 (MMP-1), MMP-3, péptido citrulinado anticíclico (CCP), factor reumatoide (RF), proteína reactiva c (CRP), amiloide A en suero (SAA), interleuquina 6 (IL-6), proteína de unión a calcio S100, osteopontina, ácido hialurónico, agrupación soluble de diferenciación 14 (sCD14), telopéptido de entrecruzamiento de terminal c de tipo I (CTX-I) y colágeno sw tipo II (CTX-II).
- 20 19. El método de la reivindicación 2, 5 o 11, en el que dicho soporte sólido es un pozo de prueba en una placa de microtítulo o una nitrocelulosa u otra membrana adecuada.
- 25 20. El método de la reivindicación 2, 5 o 11, en el que dicho soporte sólido es una perla o disco.
21. El método de la reivindicación 20, en el que dicha perla o disco se compone de un material seleccionado del grupo que consiste de vidrio, fibra de vidrio, látex y un material plástico tal como poliestireno o polivinilcloruro.
- 30 22. El método de la reivindicación 1, 5 o 11, en el que el fragmento 14-3-3 unido a dicho soporte sólido reacciona con el autoanticuerpo en una fase líquida.

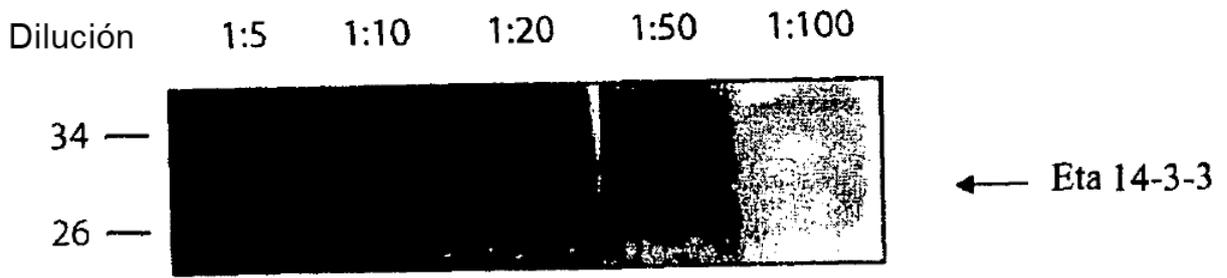


FIG. 1

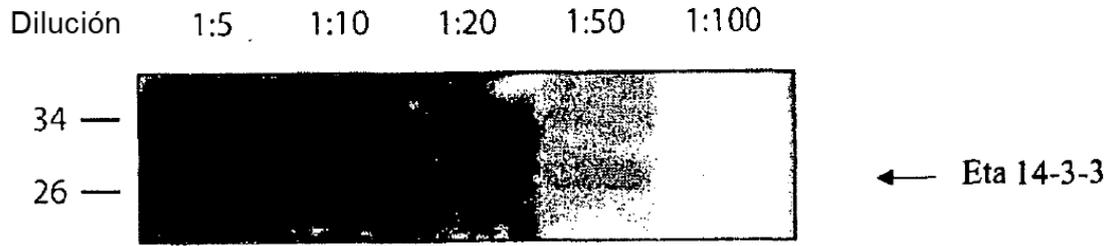


FIG. 2

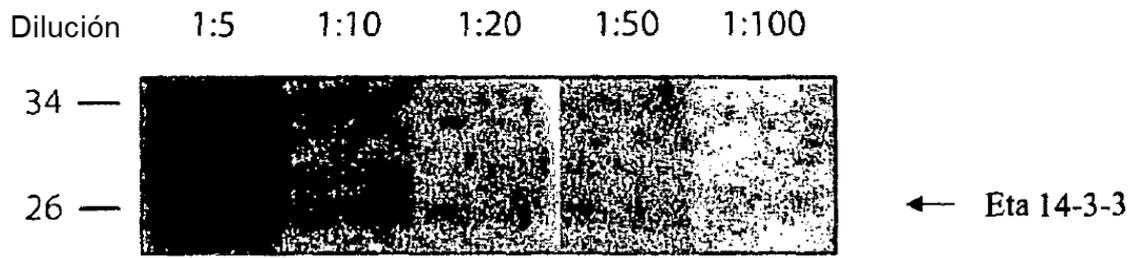


FIG. 3

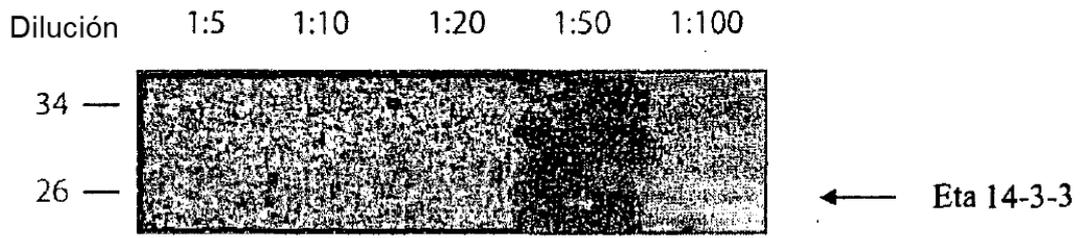


FIG. 4