

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 908**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2015 PCT/EP2015/055233**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15136053**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2015 E 15709213 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 3117215**

54 Título: **Métodos de diagnóstico para el lupus**

30 Prioridad:

13.03.2014 EP 14305364

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

19.11.2019

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)
101 rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ D'AIX MARSEILLE (33.3%) y
GFRS (GROUPE FRANCOPHONE DE RECHERCHE SUR LA SCLÉRODERMIE SYSTÉMIQUE), UNITÉ DE MÉDECINE INTERNE ET PATHOLOGIE VASCULAIRE, HÔPITAL SAINT LOUIS (33.3%)**

72 Inventor/es:

**LAMBERT, NATHALIE;
ARNOUX, FANNY y
AZZOUZ, DOUA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 731 908 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

Métodos de diagnóstico para el lupus

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método in vitro para diagnosticar lupus en un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de detectar en una muestra biológica obtenida del sujeto el autoanticuerpo que reconoce el biomarcador de proteína THEX1

Además, la invención describe equipos de reactivos y matrices útiles para llevar a cabo métodos de diagnóstico según la presente invención.

Antecedentes de la invención

10 El lupus eritematoso sistémico (SLE) o lupus es una enfermedad autoinmune crónica que puede afectar a las articulaciones y a casi todos los órganos principales del cuerpo, incluidos corazón, riñones, piel, pulmones, vasos sanguíneos, hígado y sistema nervioso. Al igual que en otras enfermedades autoinmunes, el sistema inmunológico del cuerpo ataca los propios tejidos y órganos del cuerpo, provocando la inflamación. El riesgo de una persona de desarrollar lupus parece estar determinado principalmente por factores genéticos, pero un factor ambiental, tal como
15 una infección o estrés, puede desencadenar la aparición de la enfermedad. El curso del lupus varía, y a menudo se caracteriza por períodos alternos de brotes, es decir, un aumento de la actividad de la enfermedad, y períodos de remisión. Los sujetos con lupus pueden desarrollar una variedad de afecciones tales como nefritis lúpica, complicaciones musculoesqueléticas, trastornos hematológicos e inflamación cardíaca.

20 Se tarda una media de 4 años para obtener un diagnóstico correcto de lupus, en parte debido a la variedad y complejidad de los síntomas y la necesidad de descartar otras posibles causas. The American College of Rheumatologists ha establecido once criterios para ayudar en el diagnóstico de lupus para la inclusión de pacientes en ensayos clínicos y ha desarrollado el Índice de Actividad de la Enfermedad SLE (SLEDAI) para evaluar la actividad de lupus. Además de tener en cuenta el historial médico, la edad y el sexo del sujeto y el examen físico, también están disponibles varios ensayos de laboratorio para ayudar en el diagnóstico. Estos incluyen ensayos para
25 la presencia de anticuerpos antinucleares (ANA) y ensayos para otros autoanticuerpos tales como anti-DNA, anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro (SSA), anti-Lb (SSB) y anticuerpos anticardiolipina. Otras herramientas de diagnóstico incluyen ensayos para determinar los niveles de complemento sérico, análisis de orina y biopsias de un órgano afectado. Algunos de estos criterios son muy específicos para el lupus, pero tienen poca sensibilidad, pero ninguno de estos ensayos proporciona un diagnóstico definitivo y, por lo tanto, los resultados de múltiples ensayos diferentes deben integrarse para permitir un juicio clínico de un experto. Por ejemplo, un ensayo ANA positivo puede ocurrir debido a infecciones o enfermedades reumáticas, e incluso las personas sanas sin lupus pueden dar el ensayo positivo. El ensayo ANA tiene alta sensibilidad (93%) pero baja especificidad (57%). Anticuerpos contra el DNA bicatenario y/o los nucleosomas se asociaron con el lupus hace más de 50 años y el lupus activo se asocia generalmente con la IgG. La sensibilidad y la especificidad del ensayo Farr para anti-DNA es 78,8% y 90,9%,
35 respectivamente. Por lo tanto, está claro que el estado de múltiples especies de autoanticuerpos puede proporcionar información sobre el estado del lupus de un paciente. Sin embargo, en caso de que no haya marcadores clásicos, un nuevo marcador fuerte puede ayudar a diagnosticar el Lupus.

40 Muchas especies de anticuerpos se han descrito en relación con el lupus y sus antígenos afines incluyen numerosas clases de proteínas, órganos subcelulares tales como el núcleo y especies no proteicas tales como fosfolípidos y DNA. Con frecuencia, el antígeno está mal descrito o no se caracteriza a nivel molecular, por ejemplo, anticuerpos antimitocondriales. Dados los desafíos para obtener un diagnóstico correcto, existe la necesidad de realizar ensayos in vitro nuevos o mejorados con mayor especificidad y sensibilidad para permitir el diagnóstico no invasivo de lupus.

45 El lupus se produce aproximadamente 10 veces más frecuentemente en mujeres que en hombres. Forman parte de una familia de trastornos estrechamente relacionados, conocidos como enfermedades del tejido conectivo, que también incluyen artritis reumatoide (RA), polimiositis-dermatomiositis (PM-DM), esclerosis sistémica (SSc o escleroderma), síndrome de Sjogren (SS) y varias formas de vasculitis. Estas enfermedades comparten una serie de síntomas y anomalías clínicas. Los sujetos que sufren de lupus pueden presentar una variedad de síntomas diversos, muchos de los cuales se producen en otras enfermedades del tejido conectivo, fibromialgia, dermatomiositis o afección hematológica tal como púrpura trombocitopénica idiopática. Por lo tanto, el diagnóstico
50 puede ser un reto.

Los pacientes de SSc comparten muchos autoanticuerpos con los pacientes de SLE; sin embargo, la presencia de anti-topoisomerasa o autoanticuerpos anti centrómeros sigue siendo altamente discriminatoria para el diagnóstico de SSc. Por oposición, los pacientes con SSc que no tiene ATA o ACA son difíciles de diagnosticar o clasificar.

55 Los inventores seleccionaron primero proteínas candidatas específicas de SSc reconocidas por pacientes sin ACA o ATA mediante la selección de 9483 proteínas de Invitrogen ProtoArrays® con un enfoque muy estricto. Se mantuvieron seis candidatos en esta primera selección y se validaron además para la especificidad mediante ELISA

en un gran número de pacientes incluyendo SLE, artritis reumatoide (RA), artritis psoriásica (PsoA), espondilitis anquilosante (AS), y controles sanos.

Compendio de la invención

- 5 Después de los análisis, los inventores identificaron fuertes correlaciones entre el lupus y la presencia de autoanticuerpos contra la proteína Exonucleasa 1 de la histona 3 prima de mRNA (THEX1). Además, definieron que concentraciones más bajas de antígeno podrían revelar si un paciente tenía lupus o no con una especificidad del 94% y una sensibilidad del 53%. La detección de autoanticuerpos de THEX1 en una muestra de plasma/suero es un marcador de diagnóstico para SLE, pero podría ser también un marcador de pronóstico ya que los niveles de autoanticuerpos son más altos cuando la enfermedad es más grande.
- 10 En el presente estudio, los inventores seleccionaron el análisis de la proteína THEX1 de ProtoArray® con un enfoque muy estricto y validaron su especificidad mediante ELISA en un grupo más grande de pacientes y controles.
- Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método in vitro para diagnosticar lupus en un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de detectar en una muestra biológica obtenida del sujeto el autoanticuerpo que reconoce el biomarcador de la proteína THEX1.
- 15 Además, la invención describe equipos de reactivos y matrices útiles para llevar a cabo métodos de diagnóstico según la presente invención.

Descripción detallada de la invención

- 20 En un aspecto, la presente invención proporciona un método in vitro para diagnosticar lupus en un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de detectar en una muestra biológica obtenida del sujeto el autoanticuerpo que reconoce el biomarcador de la proteína THEX1.
- El método de la invención puede comprender las etapas de: poner en contacto la muestra biológica con un biomarcador de proteínas durante un tiempo y en condiciones que permitan que se formen complejos biomarcador de proteínas-anticuerpo entre el biomarcador de proteínas y el autoanticuerpo presente en la muestra biológica; y detectar cualquier complejo biomarcador de proteínas-anticuerpo formado.
- 25 En los métodos de diagnóstico proporcionados en la presente memoria, la etapa de detectar cualquier complejo de biomarcador de proteína-anticuerpo formado entre un biomarcador de proteínas y un autoanticuerpo presentes en la muestra biológica se puede llevar a cabo mediante cualquier método adecuado. En ciertas realizaciones, la detección es mediante un inmunoensayo.
- 30 En realizaciones particulares, el biomarcador o biomarcadores de proteínas utilizados en el método de diagnóstico está/están inmovilizados en un vehículo o soporte sólido.
- Típicamente, los métodos de diagnóstico pueden comprender además medir, en una muestra obtenida del sujeto, la concentración de al menos un biomarcador de lupus también conocido para el diagnóstico de lupus (véase, por ejemplo, Sherer Y et al., 2004), para detectar la presencia de anticuerpos específicos de lupus, tales como un anticuerpo antinuclear (ANA) o un antígeno nuclear extraíble (ENA).
- 35 En otro aspecto, la presente invención describe equipos de reactivos para el diagnóstico in vitro de lupus en un sujeto. Estos equipos de reactivos comprenden: el biomarcador de proteína de la invención y al menos un reactivo para detectar un complejo de biomarcador de proteínas-anticuerpo formado entre el biomarcador de proteínas y un autoanticuerpo presentes en la muestra biológica que se va a ensayar. En estos equipos de reactivos, el biomarcador de proteínas puede estar inmovilizado en un vehículo o soporte sólido, o alternativamente, los reactivos
- 40 pueden incluirse en el equipo de reactivos que se pueden utilizar para inmovilizar el biomarcador de proteínas en un vehículo o soporte sólido. Los equipos de reactivos pueden comprender además instrucciones para llevar a cabo un método de diagnóstico según la presente invención. En ciertas realizaciones, el equipo de reactivos comprende el biomarcador de la proteína THEX1 o fragmentos del mismo.
- 45 En ciertas realizaciones, estos equipos de reactivos pueden comprender además al menos un biomarcador de lupus adicional conocido también para diagnóstico de lupus, para detectar la presencia de autoanticuerpos específicos de lupus como se describe en Sherer Y et al., 2004. Por ejemplo, el biomarcador de lupus adicional también conocido para el diagnóstico de lupus incluye, pero no se limita a un antígeno nuclear o un antígeno nuclear extraíble.
- 50 En realizaciones particulares, estos equipos de reactivos comprenden además al menos un biomarcador de lupus adicional también conocido para diagnóstico de lupus como se describe a continuación para detectar la presencia de autoanticuerpos específicos de lupus, tal como un anticuerpo antinuclear (ANA) o un antígeno nuclear anti-extraíble (ENA).
- En otro aspecto más, la presente invención describe matrices para el diagnóstico de lupus en un sujeto. Una matriz según la invención comprende, unido a su superficie, el biomarcador de proteínas de la invención. La matriz

comprende, unido a su superficie, el biomarcador de proteínas incluyendo la THEX1 descrita en la presente memoria.

5 En ciertas realizaciones, una matriz de la invención comprende además al menos un biomarcador de lupus adicional también conocido para el diagnóstico de lupus, para detectar la presencia de autoanticuerpos específicos de lupus como se describe en Sherer Y et al., 2004. Por ejemplo, el biomarcador de lupus adicional también conocido para el diagnóstico de lupus incluye, pero no se limita a un antígeno nuclear o un antígeno nuclear extraíble.

10 En realizaciones particulares, la matriz comprende, además, unido a su superficie, al menos un biomarcador de lupus adicional también conocido para diagnóstico de lupus como se describe a continuación para detectar la presencia de autoanticuerpos específicos de lupus, tal como un anticuerpo antinuclear (ANA) o un antígeno nuclear anti-extraíble (ENA).

Estos y otros objetivos, ventajas y características de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica que hayan leído la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas.

Definiciones

A lo largo de la presente memoria descriptiva, se emplean varios términos que se definen en los siguientes párrafos.

15 Como se utiliza en la presente memoria, el término “sujeto” se refiere a un ser humano u otro mamífero (por ejemplo, primate, perro, gato, cabra, caballo, cerdo, ratón, rata, conejo y similares), que puede sufrir de lupus. En una realización particular de la presente invención, el sujeto es un ser humano. En dichas realizaciones, a menudo se hace referencia al sujeto como un “individuo”. El término “individuo” no denota una edad particular y, por lo tanto, abarca a niños, adolescentes y adultos.

20 El término “sujeto sospechoso de tener lupus” se refiere a un sujeto que presenta uno o más síntomas indicativos de lupus (por ejemplo, fiebre, malestar general, dolores en las articulaciones, mialgias, fatiga), o que se analiza para el lupus (por ejemplo, durante un examen físico). De manera alternativa o adicional, un sujeto sospechoso de tener lupus puede tener uno o más factores de riesgo (por ejemplo, edad, sexo, antecedentes familiares, tabaquismo, etc.). El término abarca sujetos que no han sido examinados para el lupus, así como sujetos que han recibido un diagnóstico inicial.

25 El término “muestra biológica” se utiliza en la presente memoria en su sentido más amplio. Una muestra biológica se obtiene generalmente de un sujeto. Una muestra puede ser de cualquier tejido o fluido biológico con el que se pueda analizar el biomarcador de la presente invención. Con frecuencia, una muestra será una “muestra clínica”, es decir, una muestra derivada de un paciente. Dichas muestras incluyen, pero no se limitan a, fluidos corporales que pueden o no contener células, por ejemplo, sangre (por ejemplo, sangre entera, suero o plasma), fluido sinovial, saliva, muestras de biopsias de tejido o de aguja fina, y muestras de archivo con diagnóstico conocido, tratamiento y/o historia de resultados. Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de tejidos, tal como secciones congeladas tomadas con fines histológicos. El término “muestra biológica” también abarca cualquier material derivado del procesamiento de una muestra biológica. Los materiales derivados incluyen, pero no se limitan a, células (o su progenie) aisladas de la muestra, o proteínas extraídas de la muestra. El procesamiento de una muestra biológica puede incluir uno o más de: filtración, destilación, extracción, concentración, inactivación de componentes interferentes, adición de reactivos y similares.

En una realización particular de la invención, la muestra biológica es una muestra serológica o se deriva de sangre total, suero o plasma obtenido de un sujeto.

40 Los términos “normal” y “sano” se utilizan en la presente memoria indistintamente. Se refieren a un sujeto que no ha presentado ningún síntoma de lupus y que no ha sido diagnosticado con lupus. En particular, un sujeto normal no toma medicamentos para el lupus y no se le ha diagnosticado ninguna otra enfermedad autoinmune y no tiene antecedentes familiares de autoinmunidad. En ciertas realizaciones, los sujetos normales pueden tener sexo, edad y/o índice de masa corporal similar en comparación con el sujeto del cual se obtuvo la muestra biológica a analizar. El término “normal” también se utiliza en la presente memoria para calificar una muestra obtenida de un sujeto sano.

En el contexto de la presente invención, el término “control”, cuando se utiliza para caracterizar a un sujeto, se refiere a un sujeto que está sano o a un paciente que ha sido diagnosticado con una enfermedad autoinmune específica distinta del lupus. El término “muestra de control” se refiere a una, o más de una, muestra que se ha obtenido de un sujeto sano o de un paciente diagnosticado con una enfermedad autoinmune distinta del lupus.

50 El término “autoanticuerpo”, como se utiliza en la presente memoria, tiene un significado aceptado en la técnica, y se refiere a un anticuerpo que es producido por el sistema inmunológico de un sujeto y que se dirige contra las proteínas propias del sujeto. Los autoanticuerpos pueden atacar las propias células, tejidos y/u órganos del cuerpo, causando inflamación y daño.

55 Como se utiliza en la presente memoria, el término “autoantígeno” se refiere a un antígeno endógeno, o un fragmento activo del mismo, que estimula la producción de autoanticuerpos en un cuerpo de un sujeto, como en las

reacciones autoinmunes. El término también abarca cualquier sustancia que pueda formar un complejo antígeno-anticuerpo con autoanticuerpos presentes en un sujeto o en una muestra biológica obtenida de un sujeto.

5 Los términos “biomarcador”, “biomarcador de proteína” y “marcador” se utilizan indistintamente en la presente memoria. Se refieren a una sustancia que es un indicador distintivo de un proceso biológico, suceso biológico y/o
 5 afección patológica. En el contexto de la presente invención, el término “biomarcador de lupus” o “biomarcador de lupus” abarca la proteína THEX1 proporcionada en la presente memoria que se reconoce específicamente por los autoanticuerpos anti-THEX1 presentes en una muestra biológica (por ejemplo, muestra de sangre) de un paciente con lupus. En ciertas realizaciones preferidas, los biomarcadores de la invención son fragmentos de proteínas de
 10 menos de 20 aminoácidos. En realizaciones más preferidas, los biomarcadores de la invención son fragmentos de proteínas de entre 5 y 20 aminoácidos (es decir, 10 o 15 aminoácidos).

Como se utiliza en la presente memoria, el término “indicativo de lupus”, cuando se aplica a un proceso o un suceso, se refiere a un proceso o suceso que es un diagnóstico de lupus, de tal manera que el proceso o suceso se encuentra significativamente más a menudo en sujetos con lupus que en sujetos sanos y/o en sujetos que padecen una enfermedad distinta del lupus.

15 Los términos “proteína”, “polipéptido”, y “péptido” se utilizan indistintamente en la presente memoria, y se refieren a secuencias de aminoácidos de una variedad de longitudes, ya sea en sus formas neutras (no cargadas) o como sales, y no modificadas o modificadas por glicosilación, oxidación de la cadena lateral, o fosforilación, o citrulinación. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos es una proteína nativa de longitud completa. En otras
 20 realizaciones, la secuencia de aminoácidos es un fragmento más pequeño de la proteína de longitud completa. En aún otras realizaciones, la secuencia de aminoácidos se modifica mediante sustituyentes adicionales unidos a las cadenas laterales de aminoácidos, tales como unidades glicosílicas, lípidos o iones inorgánicos tales como fosfatos, así como modificaciones relacionadas con la conversión química de las cadenas tales como oxidación de grupos sulfidrilo. Por lo tanto, el término “proteína” (o sus términos equivalentes) pretende incluir la secuencia de
 25 aminoácidos de la proteína nativa de longitud completa, o un fragmento de la misma, sujeto a aquellas modificaciones que no cambien significativamente sus propiedades específicas. En particular, el término “proteína” abarca isoformas de proteínas, es decir, variantes que están codificadas por el mismo gen, pero que difieren en su pI o MW, o ambos. Dichas isoformas pueden diferir en su secuencia de aminoácidos (por ejemplo, como resultado de un empalme alternativo o proteólisis limitada), o en la alternativa, pueden surgir de la modificación postraducciona
 30 diferencial (por ejemplo, glicosilación, acilación, fosforilación).

30 El término “análogo”, cuando se utiliza en la presente memoria en referencia a una proteína o polipéptido, se refiere a un péptido que posee una función similar o idéntica a la proteína o polipéptido, pero no necesariamente comprende una secuencia de aminoácidos que sea similar o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la proteína o polipéptido o una estructura que es similar o idéntica a la de la proteína o polipéptido. Preferiblemente, en el
 35 contexto de la presente invención, un análogo tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, más preferiblemente, al menos aproximadamente: 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, idéntica a la secuencia de aminoácidos de la proteína o polipéptido. En ciertas realizaciones preferidas, un análogo de un biomarcador de péptidos de la invención tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica o al menos 85% idéntica a la secuencia de aminoácidos del biomarcador de péptidos.

40 El término “homólogos” (o “homología”), como se utiliza en la presente memoria, es sinónimo del término “identidad” y se refiere a la secuencia de similitud entre dos moléculas de polipéptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. Cuando una posición en ambas secuencias comparadas está ocupada por la misma base o el mismo resto de aminoácido, entonces las moléculas respectivas son homólogas en esa posición. El porcentaje de homología entre dos secuencias corresponde al número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las dos secuencias divididas por el número de posiciones comparadas y multiplicadas por 100. En general, se hace una comparación
 45 cuando dos secuencias se alinean para proporcionar la máxima homología. Las secuencias de aminoácidos homólogas comparten secuencias de aminoácidos idénticas o similares. Los restos similares son sustituciones conservativas de, o “mutaciones puntuales permitidas” de, los restos de aminoácidos correspondientes en una secuencia de referencia. Las “sustituciones conservativas” de un resto en una secuencia de referencia son sustituciones que son física o funcionalmente similares al resto de referencia correspondiente, por ejemplo, que tienen un tamaño, forma, carga eléctrica, propiedades químicas similares, incluyendo la capacidad de formar enlaces covalentes o de hidrógeno, o similares. Las sustituciones conservativas particularmente preferidas son aquellas que cumplen los criterios definidos para una “mutación puntual aceptada” por Dayhoff et al. (“Atlas of Protein Sequence and Structure”, 1978, Nat. Biomed. Res. Foundation, Washington, DC, Suppl. 3, 22: 354-352).

50 Los términos “marcado”, “marcado con un agente detectable” y “marcado con un resto detectable” se utilizan indistintamente en la presente memoria. Estos términos se utilizan para especificar que una entidad (por ejemplo, una proteína THEX1) puede visualizarse, por ejemplo, después de unirse a otra entidad (por ejemplo, un autoanticuerpo anti-THEX1). Preferiblemente, un agente o resto detectable se selecciona de manera que genere una señal que pueda medirse y cuya intensidad esté relacionada con la cantidad de entidad unida. En los métodos basados en matrices, un agente o resto detectable también se selecciona preferiblemente de manera que genere
 55 una señal localizada, permitiendo así la resolución espacial de la señal desde cada punto en la matriz. Los métodos

5 para marcar proteínas y polipéptidos son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos marcados pueden prepararse mediante incorporación de o conjugación a una etiqueta, que sea directa o indirectamente detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos, o cualquier otro medio adecuado. Los agentes detectables adecuados incluyen, pero no se limitan a, diversos ligandos, radionúclidos, colorantes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, micropartículas, enzimas, marcadores colorimétricos, marcadores magnéticos y haptenos.

10 Los términos “matriz de proteínas” y “chip de proteínas” se utilizan indistintamente en la presente memoria. Se refieren a una superficie de sustrato sobre la cual se inmovilizan diferentes proteínas o polipéptidos, de manera ordenada, en puntos discretos sobre el sustrato. Las matrices de proteínas se pueden utilizar para identificar interacciones proteína/proteína (por ejemplo, interacciones antígeno/anticuerpo), para identificar los sustratos de enzimas o para identificar los objetivos de moléculas pequeñas biológicamente activas. El término “micromatriz” se refiere específicamente a una matriz que está miniaturizada para requerir un examen microscópico para la evaluación visual.

15 El término “THEX1”, se refiere a la proteína denominada “Exonucleasa 1 de la histona 3 prima de mRNA”. La secuencia de dicha proteína se puede encontrar bajo la referencia del NCBI: NM_153332.2. La proteína THEX1 identificada como se describe en la presente memoria tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

SEQ ID N°1:

MEDPQSKEPAGEAVALALLESPPREGGEEPPRPSPEETQQCKFDGQETKGSKFI
 TSSASDFSDPVYKEIAITNGCINRMSKEELRAKLSEFKLETRGVKDVLLKRLKNYYKK
 QKLMLKESNFADSYDYICIIDFEATCEEGNPPEFVHEIIEFPVLLNHTLEIEDTFQQ
 YVRPEINTQLSDFCISLTGITQDQVDRADTFPQVLKKVIDWMKLKELGTKYKYSLLTD
 GSWDMSKFLNIQCQLSRLKYPPFAKKWINIRKSYGNFYKVPRSQTKLTIMLEKLGMD
 YDGRPHCGLDDSKNIARIAVRMLQDGCCELKINEKMHAGQLMSVSSSLPIEGTPPPQM
 PHFRK.

20 Para ser entendido ampliamente, el término “THEX1” se refiere a la proteína y también a los análogos y fragmentos de la proteína. El término “fragmento de THEX1”, se refiere a un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 restos de aminoácidos (preferiblemente, de al menos: 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, o 70 restos de aminoácidos) de la secuencia de aminoácidos de una proteína THEX1. En realizaciones preferidas de la presente invención, un fragmento del biomarcador de THEX1 de la invención comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 restos de aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos del biomarcador peptídico y no es la proteína completa.

Descripción detallada de ciertas realizaciones preferidas

30 Como se mencionó anteriormente, la presente invención proporciona un biomarcador que se puede utilizar para detectar la presencia de autoanticuerpos específicos de lupus en muestras biológicas obtenidas de pacientes. Este biomarcador es la proteína THEX1 que reacciona respectivamente y específicamente con autoanticuerpos anti-THEX1, presentes en el suero o plasma de pacientes de lupus.

Otros biomarcadores de lupus también conocidos para el diagnóstico de lupus como se describe en Sherer Y et al., 2004 se pueden utilizar en los métodos de diagnóstico de la presente invención. Por ejemplo, el biomarcador de lupus adicional también conocido para el diagnóstico de lupus se puede seleccionar en el grupo que consiste en un antígeno nuclear o un antígeno nuclear extraíble.

35 La invención también proporciona métodos para utilizar estos biomarcadores en el diagnóstico de lupus.

La invención también proporciona un biomarcador que se puede utilizar para diagnosticar la gravedad del lupus en pacientes con lupus al detectar la presencia de autoanticuerpos específicos de lupus en muestras biológicas obtenidas de pacientes. Este biomarcador es la proteína THEX1 que reacciona respectivamente y específicamente con autoanticuerpos anti-THEX1, presentes en el suero o plasma de pacientes con lupus.

40 Como lo demostraron los inventores, el nivel de autoanticuerpos anti-THEX1 se correlaciona con la gravedad de la enfermedad.

La invención también proporciona métodos para utilizar el biomarcador de THEX1 en métodos para diagnosticar la gravedad del lupus.

I – Biomarcadores de proteínas

Preparación de los biomarcadores de proteínas

5 Los biomarcadores de polipéptidos/proteínas de la presente invención se pueden preparar por cualquier método adecuado, incluyendo métodos recombinantes. Dichos métodos, como se describe, por ejemplo, en "The Proteins" (Vol. II, 3rd Ed., H. Neurath et al. (Eds), 1976, Academic Press: New York, NY, pp. 105-237) se pueden utilizar también para sintetizar los biomarcadores de la invención.

10 En ciertas realizaciones, se proporciona un biomarcador de polipéptido/proteína de la invención que se inmoviliza sobre un vehículo o soporte sólido (por ejemplo, una perla o matriz). Los métodos para inmovilizar moléculas de polipéptidos sobre una superficie sólida son conocidos en la técnica. Un polipéptido/proteína puede inmovilizarse por unión covalente o pasiva a la superficie de un vehículo o soporte sólido. Ejemplos de materiales de vehículos o soportes adecuados incluyen, pero no se limitan a, agarosa, celulosa, nitrocelulosa, dextrano, Sephadex, Sepharosa, carboximetil celulosa, poliacrilamidas, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, papel de filtro, magnetita, resinas de intercambio iónico, vidrio, copolímero de poliamina-metil-vinil-éter-ácido maleico, copolímero de aminoácido, copolímero de etileno-ácido maleico, nailon, seda y similares. La inmovilización de un biomarcador de polipéptido/proteína sobre la superficie de un vehículo o soporte sólido puede implicar reticulación, unión covalente o adsorción física, utilizando métodos bien conocidos en la técnica. El vehículo o soporte sólido puede estar en forma de una perla, una partícula, un pocillo de microplaca, una matriz, una cubeta, un tubo, una membrana o cualquier otra forma adecuada para realizar un método de diagnóstico según la invención (por ejemplo, utilizando un inmunoensayo).

20 En particular, la invención describe una matriz o matriz de proteínas para el diagnóstico del lupus, que comprende, inmovilizar en su superficie, el biomarcador de la proteína de la invención.

En un particular, la cantidad del biomarcador de proteínas utilizado para la matriz puede ser, pero no está limitado a, 0,2 µg/pocillo, 0,1 µg/pocillo, 0,05 µg/pocillo.

25 La matriz puede comprender además al menos un biomarcador de lupus adicional también conocido para el diagnóstico del lupus, para detectar la presencia de autoanticuerpos específicos de lupus como se describe en Sherer Y et al., 2004. Por ejemplo, el biomarcador de lupus adicional también conocido para el diagnóstico de lupus se puede seleccionar del grupo que consiste en un antígeno nuclear o un antígeno nuclear extraíble.

30 La presente invención también describe una matriz de suspensión de perlas de proteínas para el diagnóstico de lupus. Esta matriz de suspensión de perlas comprende una suspensión de una o más partículas o perlas distintas identificables, en la que cada perla contiene características de codificación relacionadas con su tamaño, color o firma de fluorescencia y en la que cada perla está recubierta con un biomarcador de polipéptido/proteína de la presente invención. Los ejemplos de matrices de suspensión de perlas incluyen la matriz de suspensión de perlas xMAP® (Luminex Corporation).

II – Métodos de diagnóstico

35 La presente invención proporciona métodos para el diagnóstico de lupus en un sujeto. Dichos métodos comprenden poner en contacto una muestra biológica obtenida del sujeto que se va a ensayar con el biomarcador de la invención durante un tiempo y en condiciones que permitan que se forme un complejo biomarcador-anticuerpo; y detectar el complejo biomarcador-anticuerpo formado.

El biomarcador de la invención es THEX1.

40 En este método, la detección de un complejo biomarcador-anticuerpo es indicativo de lupus en un sujeto.

En otra realización, la muestra biológica obtenida del sujeto está en contacto con otros biomarcadores de proteínas seleccionados del grupo que consiste en un antígeno nuclear o un antígeno nuclear extraíble.

45 En una realización particular, el sujeto de la invención no tiene autoanticuerpos que reconozcan uno o más biomarcadores de proteínas seleccionados del grupo de proteínas que consiste en un antígeno nuclear o un antígeno nuclear extraíble.

En una realización, la invención se refiere a un método para el diagnóstico de lupus en un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de detección de complejos de autoanticuerpos anti-THEX1.

50 En otro aspecto, la invención proporciona un método in vitro para diagnosticar la gravedad del lupus en un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de detectar en una muestra biológica obtenida del sujeto el autoanticuerpo que reconoce los biomarcadores de la proteína THEX1.

Muestras biológicas

El método de diagnóstico de la presente invención se puede aplicar a cualquier tipo de muestra biológica que permita analizar uno o más biomarcadores. Los ejemplos de muestras biológicas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sangre total, suero, plasma, saliva. Las muestras biológicas utilizadas en la práctica de la invención pueden ser muestras frescas o congeladas recogidas de un sujeto, o muestras de archivo con diagnóstico, tratamiento y/o historial de resultados conocidos. Las muestras biológicas pueden recogerse por cualquier medio no invasivo, como, por ejemplo, extrayendo sangre de un sujeto, o utilizando aspiración con aguja fina o biopsia con aguja. En ciertas realizaciones, la muestra biológica es una muestra serológica y se selecciona del grupo que consiste en sangre total, suero, plasma.

En realizaciones preferidas, los métodos de la invención se llevan a cabo en la propia muestra biológica sin, o con un procesamiento limitado de la muestra.

Sin embargo, alternativamente, los métodos de la invención se pueden realizar en un extracto de proteína preparado a partir de la muestra biológica. En este caso, el extracto de proteína contiene preferiblemente el contenido total de proteína. Los métodos de extracción de proteínas son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, "Protein Methods", D.M. Bollag et al., 2nd Ed., 1996, Wiley-Liss; "Protein Purification Methods: A Practical Approach", E.L. Harris and S. Angal (Eds.), 1989; "Protein Purification Techniques: A Practical Approach", S. Roe, 2nd Ed., 2001, Oxford University Press; "Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization", H. Ahmed, 2005, CRC Press: Boca Raton, FL). Varios equipos de reactivos se pueden utilizar para extraer proteínas de fluidos y tejidos corporales. Dichos equipos de reactivos están comercialmente disponibles en, por ejemplo, BioRad Laboratories (Hercules, CA), BD Biosciences Clontech (Mountain View, CA), Chemicon International, Inc. (Temecula, CA), Calbiochem (San Diego, CA), Pierce Biotechnology (Rockford, IL), e Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA). Las guías del usuario que describen con gran detalle el protocolo a seguir se incluyen generalmente en todos estos equipos de reactivos. La sensibilidad, el tiempo de procesamiento y los costos pueden ser diferentes de un equipo de reactivos a otro. Un experto en la técnica puede seleccionar fácilmente el (los) equipo (s) de reactivos más apropiado (s) para una situación particular.

25 Detección de los complejos biomarcador-anticuerpo

Los métodos de diagnóstico de la presente invención implican la detección de un complejo biomarcador-antígeno formado entre el biomarcador de proteína y un autoanticuerpo presentes en la muestra biológica analizada. En la práctica de la invención, la detección de dicho complejo se puede llevar a cabo mediante cualquier método adecuado (véase, por ejemplo, E. Harlow y A. Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", 1988, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY).

Por ejemplo, la detección de un complejo biomarcador-anticuerpo se puede llevar a cabo utilizando un inmunoensayo. Existe una amplia gama de técnicas de inmunoensayo, que incluyen radioinmunoensayo, inmunoensayos de enzimas (EIA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) e inmunoprecipitación por inmunofluorescencia. Los inmunoensayos son bien conocidos en la técnica. Los métodos para llevar a cabo dichos ensayos, así como las aplicaciones prácticas y los procedimientos, se resumen en los libros de texto. Ejemplos de dichos libros de texto incluyen P. Tijssen, In: Practice and theory of enzyme immunoassays, eds. R.H. Burdon y v. P.H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam (1990), pp. 221-278 y varios volúmenes de Methods in Enzymology, Eds. S.P. Colowick et al., Academic Press, que trata sobre los métodos de detección inmunológica, especialmente los volúmenes 70, 73, 74, 84, 92 y 121. Los inmunoensayos pueden ser competitivos y no competitivos.

Por ejemplo, se puede utilizar cualquiera de una serie de variaciones de la técnica de ensayo en sándwich para realizar un inmunoensayo. Brevemente, en un ensayo sándwich típico aplicado a la detección de, por ejemplo, autoanticuerpos anti-THEX1 según la presente invención, se inmoviliza un biomarcador de proteína/polipéptido THEX1 sin marcar sobre una superficie sólida (como se describe anteriormente) y la muestra biológica que se va a ensayar se pone en contacto con el biomarcador unido durante un tiempo y bajo condiciones que permiten la formación de un complejo biomarcador-anticuerpo. Después de la incubación, se añade un anticuerpo que está marcado con un resto detectable y que reconoce específicamente los anticuerpos de las especies analizadas (por ejemplo, una IgG antihumana para sujetos humanos) y se incuba en condiciones que permiten la formación de un complejo ternario entre cualquier anticuerpo unido al biomarcador y el anticuerpo marcado. Cualquier material no unido se elimina por el lavado, y la presencia de cualquier autoanticuerpo anti-THEX1 en la muestra se determina mediante la observación/detección de la señal directa o indirectamente producida por el resto detectable. Las variaciones en este ensayo incluyen un ensayo, en el que tanto la muestra biológica como el anticuerpo marcado se añaden simultáneamente al biomarcador de proteína/polipéptido THEX1 inmovilizado.

El segundo anticuerpo (es decir, el anticuerpo añadido en un ensayo en sándwich como se describe anteriormente) puede marcarse con cualquier resto detectable, es decir, cualquier entidad que, por su naturaleza química, proporcione una señal analíticamente identificable que permita la detección del complejo ternario, y en consecuencia la detección del complejo biomarcador-anticuerpo.

La detección puede ser cualitativa o cuantitativa. Los métodos para marcar moléculas biológicas tales como los anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, "Affinity Techniques. Enzyme Purification: Part B",

Methods in Enzymol., 1974, Vol 34, W.B. Jakoby y M. Wilneck (Eds.), Academic Press: New York, NY; y M. Wilchek y E.A. Bayer, Anal. Biochem., 1988, 171: 1-32).

5 Los restos detectables más comúnmente utilizados en los inmunoensayos son las enzimas y fluoróforos. En el caso de un inmunoensayo enzimático (EIA o ELISA), una enzima tal como la peroxidasa de rábano picante, la glucosa oxidasa, la beta-galactosidasa, la fosfatasa alcalina y similares, se conjuga con el segundo anticuerpo, generalmente por medio de glutaraldehído o periodato. Los sustratos que se van a utilizar con las enzimas específicas se eligen generalmente para la producción de un cambio de color detectable, por hidrólisis de la enzima correspondiente. En el caso de la inmunofluorescencia, el segundo anticuerpo se acopla químicamente a un resto fluorescente sin alteración de su capacidad de unión. Después de la unión del anticuerpo marcado con fluorescencia al complejo biomarcador-anticuerpo y la eliminación de cualquier material no unido, se detecta la señal fluorescente generada por el resto fluorescente, y opcionalmente se cuantifica. Alternativamente, el segundo anticuerpo puede marcarse con un radioisótopo, un resto quimioluminiscente o un resto bioluminiscente.

Diagnóstico de Lupus

15 En el método de la presente invención, la detección de un complejo biomarcador-anticuerpo es indicativa de la presencia de anticuerpos THEX1 en la muestra biológica ensayada y es indicativa, por lo tanto, de lupus en el sujeto del cual se ha obtenido la muestra biológica. Por lo tanto, los métodos de la presente invención se pueden utilizar para el diagnóstico de lupus en pacientes. En particular, el método de la invención se puede utilizar para ensayar sujetos que se sospecha que tengan lupus o se puede utilizar para probar la gravedad del lupus en sujetos.

20 Un experto en la técnica apreciará que el diagnóstico de lupus se puede realizar únicamente sobre la base de los resultados obtenidos mediante un método proporcionado en la presente memoria. Alternativamente, un médico también puede considerar otros parámetros clínicos o patológicos utilizados en los métodos existentes para diagnosticar el lupus. Por lo tanto, los resultados obtenidos utilizando los métodos de la presente invención pueden compararse y/o combinarse con los resultados de otros ensayos o procedimientos realizados para el diagnóstico de lupus. Dicha comparación y/o combinación pueden ayudar a proporcionar un diagnóstico más refinado.

25 Por ejemplo, los métodos de diagnóstico de lupus de la presente invención se pueden utilizar en combinación con criterios de lupus [Tan EM et al., 1982; Hochberg MC, 1997; Petri M et al., 2012].

30 Alternativa o adicionalmente, los resultados de los métodos de diagnóstico de lupus de la presente invención se pueden utilizar en combinación con los resultados de uno o más ensayos que emplean otros biomarcadores de lupus. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el diagnóstico de lupus se puede basar en los resultados de un método de la invención y en los resultados de uno o más ensayos adicionales que utilizan un biomarcador de lupus diferente. Por ejemplo, un panel de biomarcadores de lupus se puede ensayar individualmente o simultáneamente, por ejemplo, utilizando un chip o una tecnología de matriz basada en perlas.

35 Ejemplos de biomarcadores de lupus adecuados incluyen biomarcadores de lupus también conocidos para el diagnóstico de lupus como se describe en Sherer Y et al., 2004. Por ejemplo, un biomarcador de lupus adecuado también conocido para el diagnóstico de lupus incluye, pero no se limita a un antígeno nuclear o un antígeno nuclear extraíble.

40 En otra realización, el método según la invención, la muestra biológica obtenida del sujeto está en contacto con el biomarcador de la invención y uno o más biomarcadores de proteínas seleccionados del grupo de proteínas que consiste en un biomarcador de lupus también conocido por el diagnóstico de lupus como se describe en Sherer Y et al., 2004. Por ejemplo, un biomarcador de lupus adecuado también conocido para el diagnóstico de lupus incluye, pero no se limita a, un antígeno nuclear o un antígeno nuclear extraíble.

III – Equipos de reactivos

45 En otro aspecto, la presente invención describe equipos de reactivos que comprenden materiales útiles para llevar a cabo un método de diagnóstico según la presente invención. Los procedimientos de diagnóstico que se proporcionan en la presente memoria pueden ser realizados por laboratorios de diagnóstico, laboratorios experimentales o profesionales. La invención proporciona equipos de reactivos que se pueden utilizar en estas diferentes configuraciones.

50 Los materiales y reactivos para detectar autoanticuerpos anti-THEX1 en una muestra biológica y/o para diagnosticar lupus, en un sujeto según la presente invención, pueden ensamblarse juntos en un equipo de reactivos. Cada equipo de reactivos de la invención comprende al menos un biomarcador de proteína/polipéptido de la invención preferiblemente en una cantidad que sea adecuada para la detección de autoanticuerpos en una muestra biológica.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, un equipo de reactivos de la invención comprende el biomarcador THEX1.

En otra realización, la presente invención describe equipos de reactivos que comprenden materiales útiles para diagnosticar la gravedad del lupus en un sujeto.

El biomarcador(s) de péptidos incluido en un equipo de reactivos puede o no estar inmovilizado sobre la superficie del sustrato (por ejemplo, perlas, matrices, y similares). Por lo tanto, en realizaciones preferidas, un equipo de reactivos de la invención incluye una matriz para diagnosticar lupus como se proporciona en la presente memoria. Alternativamente, una superficie del sustrato se puede incluir en un equipo de reactivos de la invención para la inmovilización de los biomarcadores de péptidos.

5

Un equipo de reactivos de la invención comprende también generalmente al menos un reactivo para la detección del complejo biomarcador-anticuerpo formado entre el biomarcador del péptido incluido en el equipo de reactivos y un autoanticuerpo presentes en la muestra biológica. Dicho reactivo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo marcado que reconoce específicamente anticuerpos de las especies ensayadas (por ejemplo, una IgG antihumana para sujetos humanos), como se describió anteriormente.

10

Dependiendo del procedimiento, el equipo de reactivos puede comprender además uno o más de los siguientes: tampón y/o reactivos de extracción, tampón y/o reactivos de bloqueo, tampón y/o reactivos de inmunodetección, tampón y/o reactivos de marcaje, y medios de detección. Los protocolos para utilizar estos tampones y reactivos para realizar las diferentes etapas del procedimiento pueden incluirse en el equipo de reactivos.

15

Los diferentes reactivos incluidos en el equipo de reactivos de la invención se pueden suministrar en una forma sólida (por ejemplo, liofilizada) o líquida. Los equipos de reactivos de la presente invención pueden comprender opcionalmente diferentes envases (por ejemplo, vial, ampolla, tubo de ensayo, matraz o botella) para cada tampón y/o reactivo individual. En general, cada componente será adecuado como partes alícuotas en su envase respectivo o se proporcionará en forma concentrada. También se pueden proporcionar otros envases adecuados para realizar ciertas etapas de los métodos descritos. Los envases individuales de los equipos de reactivos se mantienen preferiblemente en confinamiento cercano para la venta comercial.

20

En ciertas realizaciones, un equipo de reactivos comprende instrucciones para utilizar sus componentes para el diagnóstico de lupus, en un sujeto según un método de la invención. Las instrucciones para utilizar el equipo de reactivos según los métodos de la invención pueden comprender instrucciones para el procesamiento de la muestra biológica obtenida del sujeto y/o para realizar el ensayo, y/o instrucciones para interpretar los resultados. Un equipo de reactivos puede contener también un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o productos biológicos.

25

La invención se ilustrará además mediante la siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

30 Figuras

Figura 1: autoanticuerpos contra THEX1 (0,2 µg/pocillo) analizados en subgrupos de pacientes con SSc y otras enfermedades. A) Porcentaje de individuos positivos, B) valores de ΔOD.

SSc: esclerosis sistémica; HC: controles sanos; Rheum D: enfermedades reumáticas incluyendo artritis reumatoide (RA), artritis psoriásica (PsoA), espondilitis anquilosante (AS), SLE: lupus eritematoso sistémico.

35

P1: valor de p en comparación con HC (ensayo de χ^2 con corrección de Bonferroni);

P2: valor de p en comparación con Rheum D (ensayo de χ^2 con corrección de Bonferroni);

ns: no significativa; NA: no aplicable

*valores de p < 0,05; ***valores de p < 0,005; ****valores de p < 0,0001 con el ensayo de Mann Whitney.

40

Figura 2: anticuerpos contra THEX1 (0,1 µg/pocillo) analizados en subgrupos de pacientes con SSc y otras enfermedades. A) Porcentaje de individuos positivos, B) valores de χ OD.

SSc: esclerosis sistémica; HC: controles sanos; Rheum D: enfermedades reumáticas incluyendo artritis reumatoide (RA), artritis psoriásica (PsoA), espondilitis anquilosante (AS), SLE: lupus eritematoso sistémico.

P1: valor de p en comparación con HC (ensayo de χ^2 con corrección de Bonferroni);

P2: valor de p en comparación con Rheum D (ensayo de χ^2 con corrección de Bonferroni);

45

ns: no significativa; NA: no aplicable

****valores de p < 0,0001 con el ensayo de Mann Whitney.

Figura 3: correlación entre los valores de χ OD y la gravedad de la enfermedad en pacientes con SLE (N = 84). SLEDAI: índice de actividad de la enfermedad del lupus eritematoso sistémico.

P (dos-colas) < 0,0001

Ejemplos

Material y métodos

Características de los participantes.

5 Para el análisis de ProtoArray, se reclutaron muestras de plasma de 20 pacientes con SSc incluyendo 8 pacientes negativos para ATA y ACA (Abneg), 6 positivos para ATA y 6 positivos para ACA de 5 hospitales franceses. Los
10 pacientes con SSc se compararon con 18 controles, incluyendo 8 individuos sanos sin antecedentes de enfermedades autoinmunes (AID) reclutados en el Centre d'Examen de Sante de l'Assurance Maladie (CESAM), Marsella, Francia y 10 pacientes con otros AID incluyendo artritis reumatoide (RA), lupus eritematoso sistémico (SLE) y escleroderma localizado (LocSc) reclutados en la unidad de reumatología de St Marguerite Hospital en Marsella. El perfil de autoanticuerpos de los pacientes (ATA, ACA, Abneg) y el subtipo de enfermedad de los
15 pacientes (Lc-SSc, Dc-SSc) se obtuvo al revisar las historias médicas. Es de notar que los pacientes de Abneg son negativos para ATA y ACA, pero podrían ser positivos para otros autoanticuerpos (anti-RNA polimerasa III, anti-U3RNP) pero esto no se reportó en los registros médicos.

15 Después de la determinación de las proteínas específicas por ProtoArrays, se realizaron análisis ELISA de las seis proteínas candidatas en una cohorte más grande de pacientes y controles reclutados de los mismos hospitales y centros descritos anteriormente. Se ensayaron un número total máximo de 126 pacientes con SSc, 105 pacientes con SLE, de los cuales 84 estaban disponibles en el índice de Actividad de la Enfermedad (SLEDAI), 106 pacientes con RA, todos positivos para anticuerpos de proteínas anti-citrulinadas (ACPA), 39 pacientes con AS, 40 pacientes con PsoA y 133 controles sanos (datos no mostrados).

20 Declaraciones de ética

Todos los participantes firmaron el consentimiento según la Declaración de Helsinki [Vollmann J et al., 1996]. El estudio está registrado en el INSERM con el número del Biomedical Reserach Protocol RBM-04-10 o como una colección registrada con el número DC-2008-327.

Detección de autoanticuerpos mediante matrices de proteínas

25 Las micromatrices de proteínas humanas ProtoArray V5.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) se puntuaron por duplicado en un portaobjetos de vidrio recubierto con nitrocelulosa con 9483 proteínas humanas expresadas utilizando un sistema de expresión de baculovirus, purificado a partir de células de insecto (lista de contenido de proteínas 5.0). Primero se bloquearon las matrices para evitar la hibridación no específica con el tampón de bloqueo (BSA al 1%, 1X PBS, Tween® 20 al 0,1%) a 4°C durante 1 hora (PartnerChip, Evry, Francia). Muestras de plasma,
30 diluida 1:500 en tampón de sonda (1X PBS, MgCl₂ 5mM, DTT 0,5 mM, glicerol al 5%, Triton® X-100 al 0,05%, BSA al 1%) se añadieron a las matrices y se incubaron durante 90 minutos a 4°C en una cámara de incubación/hibridación. Las matrices se lavaron después 3 veces durante 8 minutos con 20 ml de tampón de sonda antes de añadir una solución de 1,0 µg/ml de IgG antihumana conjugada a Alexa Fluor® 647 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durante 90 minutos a 4°C. Las matrices se lavaron de nuevo 3 veces como se describió anteriormente y
35 se secaron a temperatura ambiente. Las matrices se escanearon con un escaner NimbleGen MS 200 (Roche, Basel Switzerland). Los datos de fluorescencia se adquirieron con un Software GenePix Pro y se procesaron utilizando Protoarray Prospector 5.2 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Análisis de los datos de ProtoArray®

40 El software ProtoArray® Prospector incluye un algoritmo de normalización lineal que facilita el análisis de datos entre ensayos y los algoritmos de estadísticas M para comparaciones entre grupos cruzados para la identificación de biomarcadores. Estas herramientas estadísticas permiten comparar los resultados entre pares de grupos para identificar las sondas que han aumentado consistentemente las señales en el grupo de pacientes con SSc con respecto al grupo de control (individuos sanos y pacientes con otro AID).

Detección de autoanticuerpos mediante ELISA

45 ProtoArrays permitió identificar seis candidatos: Factor de crecimiento de fibroblasto 2 (FGF2), variante de transcripción 1 del factor inflamatorio de aloinjerto 1 (AIF1), receptor 2 de la efrina tipo B (EphB2), proteína quinasa de doble especificidad CLK1, Exonucleasa 1 de la histona 3 prima de mRNA (THEX1), repetición de anquirina y dominio del motivo alfa estéril conteniendo 6 (ANKS6). Las proteínas candidatas se obtuvieron en Invitrogen, excepto FGF2 que se adquirió en Millipore (CA, USA). Las placas (Nunc, Kamstrupvej, Denmark) se recubrieron
50 durante una noche a 4°C con 0,2 µg de proteína candidato por pocillo diluida en PBS (excepto ANKS6 para la que las condiciones de trabajo se definieron en 0,1 µg/pocillo y THEX1 que se ensayó con ambas concentraciones). Las placas se bloquearon con PBS al 2% de BSA durante una noche. Después de eliminar la disolución de bloqueo, se añadieron las muestras de plasma diluidas a 1:100. Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron 3 veces (1 minuto) con PBS al 0,1% de Tween 20 y se añadió IgG antihumana conjugada con peroxidasa (Sigma Aldrich, St Quentin-Faallavier, Francia) durante media hora. Después de lavar, las placas se
55

revelaron entonces con el sistema de sustrato líquido de tetrametilbencidina (TMB) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). La densidad óptica (OD) se leyó a 405 nm en un espectrofotómetro de microplacas PowerWave XS (Biotek, Colmar, Francia). Para cada individuo, se obtuvo una OD de fondo añadiendo plasma en pocillos duplicados sin la proteína ensayada. El plasma positivo se definió por un valor de OD superior o igual al doble del OD de fondo (positivo $\Delta OD = 0$ o más).

Análisis estadístico

Para determinar si una proteína candidata fue significativamente mejor reconocida por los plasmas de pacientes con SSc que los controles sanos y/o pacientes con otras enfermedades reumáticas, los valores de p se calcularon utilizando el ensayo χ^2 y se corrigieron para comparaciones múltiples (Bonferroni). Ya que se compararon 4 grupos (SSc, SLE, HC y otras enfermedades reumáticas incluyendo RA, AS y PsoA) se aplicó una corrección de 4. Para las comparaciones de ΔOD entre grupos, los valores de p se evaluaron utilizando el ensayo de Mann Whithney (Graphpad Prism 5). La correlación entre ΔOD y la gravedad de la enfermedad (SLEDAI) para SLE se llevó a cabo mediante la correlación de rango de Spearman.

Resultados

15 Titulación de THEX1 para un diagnóstico diferencial entre pacientes de SLE y SSc de Abneg

Analizamos THEX1 y probamos si dos concentraciones de proteínas diferentes (0,2 y 0,1 $\mu\text{g/pocillo}$) discriminarían enfermedades y subgrupos de pacientes con SSc estratificados por perfiles de autoanticuerpos (ATA, ACA, Abneg).

20 Cuando ensayamos a 0,2 $\mu\text{g/pocillo}$, THEX1 fue solo específico de SSc y SLE. Fue reconocido por las tres categorías de pacientes con SSc (ATA, ACA y Abneg). Es interesante que el 55% de pacientes de Abneg (Figura 1A) reconocieron significativamente esta proteína con un ΔOD medio de 0,032 (Figura 1B) frente a solo el 30% de los controles sanos (ΔOD medio = -0,001) y el 25% de otras enfermedades reumáticas (ΔOD medio = -0,012).

Sin embargo, la mayor positividad (87% Figura 1A) y el ΔOD medio más alto (0,231, Figura 1B) se observaron en pacientes con SLE.

25 Cuando se ensayó a una concentración más baja de 0,1 $\mu\text{g/pocillo}$ (Figura 2A y 2B), solo los pacientes con SLE (N = 105) permanecieron positivos en comparación con cualquier grupo de pacientes ensayados o con todos los otros grupos (N = 444). De hecho, el 53% de los pacientes con SLE reconocieron la proteína con un ΔOD medio de 0,147 en comparación con solo el 6% de todos los otros sujetos (HC, N = 133; Rheum D, N = 185; SSc, N = 126) con un ΔOD medio para 444 sujetos de -0,042 ($p < 10^{-33}$).

ΔOD de THEX1 se correlaciona con la gravedad de la enfermedad SLE

30 Obtuvimos las informaciones de SLEDAI para 84 pacientes con SLE y pudimos analizar si los valores más altos de ΔOD de THEX1 se correlacionaban con SLEDAI elevados. Encontramos una correlación significativa (ensayo de Spearman, Figura 3) entre la gravedad de la enfermedad de SLE y la mayor presencia de autoanticuerpos THEX1 en el plasma de los pacientes, lo que indica que THEX1 podría ser un marcador de la gravedad.

35 Datos adicionales: características clínicas y serológicas de pacientes con lupus, positivo o negativo para anticuerpos anti-THEX1 (a 0,1 $\mu\text{g/pocillo}$).

No hubo diferencias significativas en el género o la etnia entre los pacientes con lupus, positivo o negativo, para los anticuerpos anti-THEX1, pero los pacientes que fueron positivos para THEX1 tenían más a menudo otros autoanticuerpos como anti-dsDNA, anti-Sm y anti-SSB. Sin embargo, es de notar que THEX1 también fue útil para identificar pacientes sin anticuerpos anti-dsDNA, ya que reconoció a más de un tercio de ellos (36%, N = 39).

40 Los pacientes con la enfermedad activa fueron más a menudo positivos para anticuerpos anti-THEX1 ($p = 0,0002$). Esto se confirmó mediante una correlación significativa entre SLEDAI y los niveles más altos de autoanticuerpos THEX1 en el plasma de los pacientes (correlación de Spearman, $p < 0,0001$), lo que indica que THEX1 podría ser un marcador de actividad. Los tratamientos no fueron diferentes entre los pacientes positivos o negativos para los autoanticuerpos THEX1. Los pacientes a menudo se encontraban bajo corticoides o hidroxicloroquina y en las mismas proporciones en ambos grupos (datos no mostrados).

Conclusión

50 Nuestros resultados revelaron que THEX1, ensayado en una gran cohorte de pacientes de SLE (N = 105) y una gran cohorte de controles (N = 444) es un nuevo marcador para el diagnóstico de SLE, con una especificidad del 94% y una sensibilidad del 53% (a concentraciones de 0,1 $\mu\text{g/pocillo}$). Además, THEX1 es un marcador de la gravedad ya que los valores más altos de ΔOD de THEX1 se correlacionaron con SLEDAI elevados.

Referencias

A lo largo de esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

Hochberg MC. Actualización de los criterios revisados por el American College of Rheumatology para la clasificación del lupus eritematoso sistémico. *Arthritis Rheum* 1997 Sep; 40(9): 1725.

- 5 Petri M, Orbai AM, Alarcon GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivación y validación de los criterios de clasificación para el lupus eritematoso sistémico de Systemic Lupus International Collaborating Clinics. *Arthritis Rheum* 2012 Aug; 64(8): 2677-86.

- 10 Sherer Y, Gorstein A, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Explosión de autoanticuerpos en el lupus eritematoso sistémico: más de 100 anticuerpos diferentes encontrados en pacientes con SLE. *Seminarios en artritis y reumatismo*. [Revisión]. 2004 Oct; 34(2): 501-37.

Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. El criterio revisado de 1982 para la clasificación del lupus eritematoso sistémico. *Arthritis Rheum* 1982 Nov; 25(11): 1271-7.

Vollmann J, Winau R. Consentimiento informado en experimentación humana antes del código de Nuremberg. *BMJ*. 1996 Dec 7; 313 (7070): 1445-9.

15

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSERM

5 <120> MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA EL LUPUS

<130> BI013093 LAMBERT

10 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1

<211> 349

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Asp Pro Gln Ser Lys Glu Pro Ala Gly Glu Ala Val Ala Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Glu Ser Pro Arg Pro Glu Gly Gly Glu Glu Pro Pro Arg
 20 25 30

Pro Ser Pro Glu Glu Thr Gln Gln Cys Lys Phe Asp Gly Gln Glu Thr
 35 40 45

Lys Gly Ser Lys Phe Ile Thr Ser Ser Ala Ser Asp Phe Ser Asp Pro
 50 55 60

Val Tyr Lys Glu Ile Ala Ile Thr Asn Gly Cys Ile Asn Arg Met Ser
 65 70 75 80

Lys Glu Glu Leu Arg Ala Lys Leu Ser Glu Phe Lys Leu Glu Thr Arg
 85 90 95

Gly Val Lys Asp Val Leu Lys Lys Arg Leu Lys Asn Tyr Tyr Lys Lys
 100 105 110

Gln Lys Leu Met Leu Lys Glu Ser Asn Phe Ala Asp Ser Tyr Tyr Asp
 115 120 125

Tyr Ile Cys Ile Ile Asp Phe Glu Ala Thr Cys Glu Glu Gly Asn Pro
 130 135 140

Pro Glu Phe Val His Glu Ile Ile Glu Phe Pro Val Val Leu Leu Asn
 145 150 155 160

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

ES 2 731 908 T3

Glu Ile Asn Thr Gln Leu Ser Asp Phe Cys Ile Ser Leu Thr Gly Ile
 180 185 190

Thr Gln Asp Gln Val Asp Arg Ala Asp Thr Phe Pro Gln Val Leu Lys
 195 200 205

Lys Val Ile Asp Trp Met Lys Leu Lys Glu Leu Gly Thr Lys Tyr Lys
 210 215 220

Tyr Ser Leu Leu Thr Asp Gly Ser Trp Asp Met Ser Lys Phe Leu Asn
 225 230 235 240

Ile Gln Cys Gln Leu Ser Arg Leu Lys Tyr Pro Pro Phe Ala Lys Lys
 245 250 255

Trp Ile Asn Ile Arg Lys Ser Tyr Gly Asn Phe Tyr Lys Val Pro Arg
 260 265 270

Ser Gln Thr Lys Leu Thr Ile Met Leu Glu Lys Leu Gly Met Asp Tyr
 275 280 285

Asp Gly Arg Pro His Cys Gly Leu Asp Asp Ser Lys Asn Ile Ala Arg
 290 295 300

Ile Ala Val Arg Met Leu Gln Asp Gly Cys Glu Leu Arg Ile Asn Glu
 305 310 315 320

Lys Met His Ala Gly Gln Leu Met Ser Val Ser Ser Ser Leu Pro Ile
 325 330 335

Glu Gly Thr Pro Pro Pro Gln Met Pro His Phe Arg Lys
 340 345

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para diagnosticar lupus en un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de detectar en una muestra biológica obtenida del sujeto el autoanticuerpo que reconoce el biomarcador de la proteína THEX1.
2. El método según la reivindicación 1 en donde dicho método que comprende las etapas de:
 - 5 poner en contacto la muestra biológica obtenida del sujeto con el biomarcador de THEX1 y detectar cualquier complejo biomarcador-anticuerpo formado, en donde la detección del complejo biomarcador-anticuerpo es indicativo de lupus en el sujeto.
 3. El método según las reivindicaciones 1 o 2 en donde otros autoanticuerpos específicos de lupus, tales como un anticuerpo antinuclear (ANA) o un antígeno nuclear anti-extraíble (ENA) se pueden detectar en una muestra
- 10 biológica obtenida del sujeto.

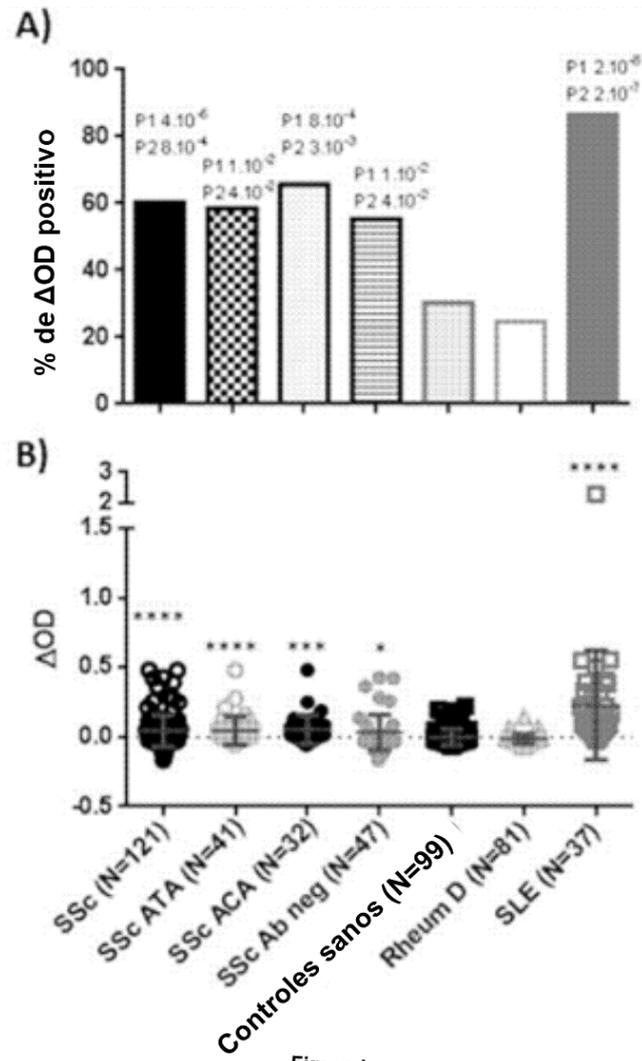


Figura 1

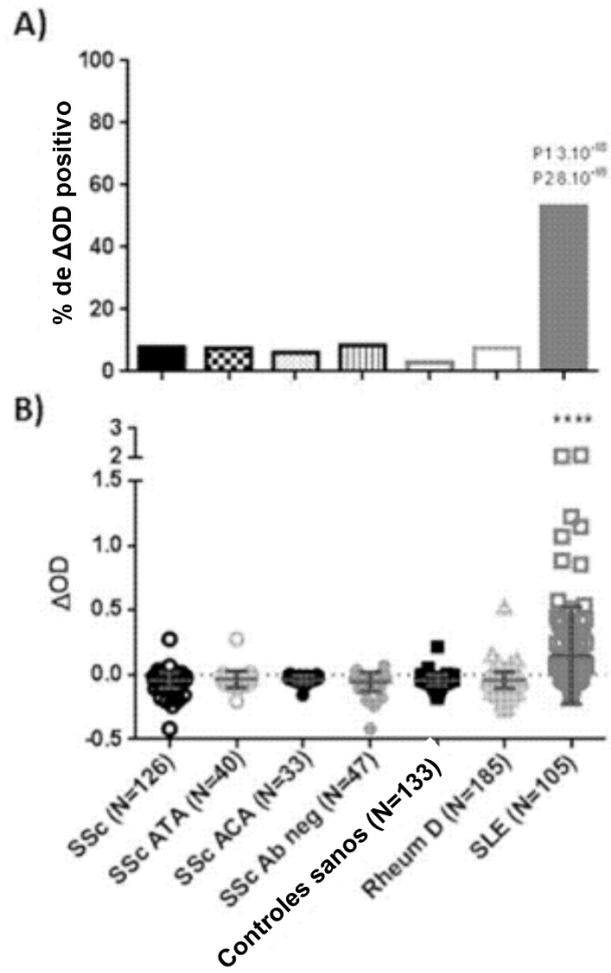


Figura 2

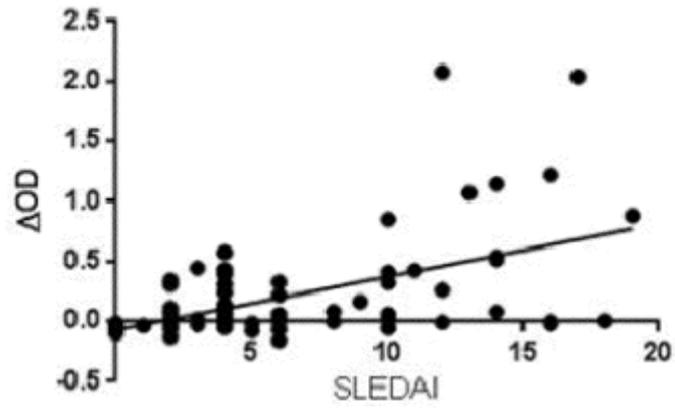


Figura 3