

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2010/128193 A1**

(43) Fecha de publicación internacional  
11 de noviembre de 2010 (11.11.2010)

PCT

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:  
*G01N 33/543* (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)  
*G01N 33/564* (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2010/070301
- (22) Fecha de presentación internacional:  
5 de mayo de 2010 (05.05.2010)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:  
P 200930125 5 de mayo de 2009 (05.05.2009) ES
- (71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US):  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **TAN TOCK SENG HOSPITAL** [SG/SG]; 11 Jalan, Tan Tock Seng 308433 (SG).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **SANCHO LÓPEZ, Jaime** [ES/ES]; Instituto de Parasitología Y Biomedicina López Neyra (IPBLN), Avda. del Conocimiento, s/n, E-18100 Armilla (Granada) (ES). **MENG KHOO, Keng** [SG/SG]; Tan Tock Seng Hospital, 11 Jalan, Tan Tock Seng 308433 (SG). **HEE CHNG, Hiok** [SG/SG]; Tan Tock Seng Hospital, 11 Jalan, Tan Tock Seng 308433 (SG).
- (74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada:**

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR THE DIAGNOSIS, PROGNOSIS AND/OR TREATMENT OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

(54) Título : MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y/O TRATAMIENTO DEL LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

(57) Abstract: The present invention relates to the field of biomedicine. Specifically, the invention provides methods that allow the diagnosis, prognosis and/or treatment of systemic lupus erythematosus (SLE) disease.

(57) Resumen: La presente invención se encuadra dentro del campo de la biomedicina. Específicamente, provee de métodos que permiten el diagnóstico, el pronóstico y/o el tratamiento de la enfermedad del Lupus Eritematoso Sistémico (LES).



WO 2010/128193 A1

**MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y/O TRATAMIENTO**  
**DEL LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO.**

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biomedicina.  
5 Específicamente, provee de métodos que permiten el diagnóstico, el pronóstico  
y/o el tratamiento de la enfermedad del Lupus Eritematoso Sistémico (LES).

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

10

El Lupus Eritematoso Sistémico, también llamado por sus iniciales LES, es una  
alteración del sistema inmunitario en el que se producen importantes  
cantidades de anticuerpos que reaccionan con los tejidos del propio paciente  
(autoanticuerpos). Puede originar erupciones cutáneas, artritis, anemia,  
15 convulsiones o problemas psiquiátricos y, a menudo, afecta a otros órganos  
internos entre los que se incluyen el riñón, los pulmones y el corazón.

A causa de la amplia variedad de síntomas, y a que se trata de una  
enfermedad que cursa con brotes y remisiones, el diagnóstico exacto del LES  
20 es difícil. Esta dificultad, en muchas ocasiones, tiene como consecuencia la  
demora en la identificación de la enfermedad y la instauración del tratamiento,  
lo que conduce a conduce al daño progresivo y a la muerte. Actualmente, no se  
dispone de un terapia efectiva del LES, sin embargo, el tratamiento permite  
mejorar la calidad de vida del paciente. El tratamiento medicamentoso debe  
25 individualizarse para cada paciente, y depende de las manifestaciones clínicas  
y de la actividad de la enfermedad en cada momento. La determinación del  
grado o intensidad de la enfermedad es de gran ayuda para el pronóstico a  
largo plazo y determinante para indicar el tratamiento apropiado.

30 CD38 es una proteína de membrana de tipo II que se expresa en un número  
elevado de células y tejidos de diverso origen (Fernandez et al. 1998. J Biol  
Regul Homeost Agents, 12, 81-91; Khoo y Chang. 1999. Brain Res, 821, 17-

- 25). Forma parte de una familia de proteínas con capacidad para catalizar la conversión de NAD<sup>+</sup> en cADPR (Graeff et al. 2001. J Biol Chem, 276, 12169-12173.). Además de esta actividad enzimática CD38 también puede catalizar una reacción de transglicosilación intercambiando la nicotinamida del sustrato NADP con ácido nicotínico produciéndose NAADP (Lee. 2001. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 41, 317-345). Tanto el cADPR como el NAADP son potentes segundos mensajeros implicados en la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Gasser et al. 2006. J Biol Chem, 281, 16906-16913).
- 10 Se ha propuesto que CD38 podría jugar un papel en la patogénesis de la diabetes (Okamoto. 1999. Mol Cell Biochem, 193, 115-118), relacionado con la presencia de autoanticuerpos anti-CD38 en pacientes con diabetes tipo II en Japón (Ikehata et al. 1998.. J Clin Invest, 102, 395-401), así como en pacientes Caucasicos en diabetes tipo I y II en Italia (Mallone y Perin. 2006. Diabetes Metab Res Rev, 22, 284-294; Antonelli y Ferrannini. 2004. J Endocrinol Invest, 15 27, 695-707.). De hecho, se ha descrito que los autoanticuerpos anti-CD38 inducen la secreción de insulina en cultivos *in vitro* de islotes de Langerhans humanos tanto en presencia de niveles altos o bajos de glucosa (Antonelli et al. 2001.. Diabetes, 50, 985-991). Posteriormente, se demostró que la incubación prolongada de los islotes con autoanticuerpos anti-CD38 provoca la pérdida de 20 función de las células beta y una disminución de su viabilidad (Marchetti et al. 2002. Diabetes, 51 Suppl 3, S474-477.). También se han detectado autoanticuerpos anti-CD38 en otras enfermedades autoinmunes como tiroiditis y en la enfermedad de Graves, relacionando dichos autoanticuerpos con las 25 formas más agresivas de estas enfermedades (Antonelli et al. 2001. Clin Exp Immunol, 126, 426-431.). Sin embargo, el único estudio realizado hasta la fecha en pacientes con LES sugiere que un aumento de autoanticuerpos anti-CD38 no sería significativo en esta enfermedad autoinmune.

## EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

Existe la necesidad de disponer de un sistema sencillo que permita detectar la enfermedad del Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y su grado de afección con el fin de determinar el tratamiento terapéutico a instaurar. Por otra parte, actualmente, no existe una terapia efectiva para el tratamiento del LES, siendo esencial el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas para tratar la enfermedad. La presente invención provee de métodos que permite el diagnóstico, el pronóstico y/o el tratamiento de la enfermedad del (LES).

10

En la presente invención se demuestra que los niveles de anticuerpos anti-CD38 son significativamente más elevados en sujetos con LES que en individuos sanos. De hecho, los niveles de anticuerpos anti-CD38 son más elevados en aquellos sujetos con un índice de actividad lúpica SLEDAI alto, que en aquellos pacientes que tienen un índice de actividad lúpica menor.

15

Además, en la presente invención se muestra que la presencia de autoanticuerpos tiene una relación funcional con la patogénesis del LES. Por un lado, existe una correlación positiva entre los niveles de anticuerpos anti-CD38 y la concentración en plasma de citoquinas en pacientes con LES, cuya importancia en la patogénesis de la nefritis lúpica ha sido establecida. Por otro lado, el plasma de pacientes con LES produce un aumento del calcio intracelular en linfocitos T.

20

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o el pronóstico del LES que comprende:

25

- a) obtención de una muestra biológica aislada de un sujeto,
- b) análisis de la cantidad de autoanticuerpos anti-CD38 en la muestra obtenida en el paso (a); y

30

- c) comparación de la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

Preferiblemente, los pasos (b) y/o (c) del método pueden ser total o  
5 parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico  
sensor para la detección de la cantidad en el paso (b) o la comparación  
computerizada en el paso (c).

Además de los pasos especificados anteriormente puede comprender otros  
10 pasos adicionales, por ejemplo relacionados con el pre-tratamiento de la  
muestra o la evaluación de los resultados obtenidos mediante este método.

Otro aspecto de la presente invención, se refiere a un método de diagnóstico  
del LES que comprende los pasos (a)-(c) mencionados anteriormente, y que  
15 además comprende un paso (d) donde una cantidad de autoanticuerpos anti-  
CD38 detectada en el paso (b) mayor que la cantidad de referencia con la que  
se compara en el paso (c) es indicativa de la presencia de un LES.

Otro aspecto de la presente invención, se refiere a un método de pronóstico del  
20 LES que comprende los pasos (a)-(c) descritos anteriormente, que además  
comprende un paso (d) donde una cantidad de autoanticuerpos anti-CD38  
detectada en el paso (b) mayor que la cantidad de referencia con la que se  
compara en el paso (c) permite asignar al sujeto un índice de actividad lúpica...

25 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el método de  
pronóstico del LES que comprende los pasos (a)-(c) descritos anteriormente,  
además comprende un paso (d) donde una cantidad de autoanticuerpos anti-  
CD38 detectada en el paso (b) mayor que la cantidad de referencia con la que  
se compara en el paso (c) permite asignar al sujeto un índice de actividad  
30 lúpica SLEDAI alto.

El término "Lupus Eritematoso Sistémico" se refiere a una enfermedad autoinmune crónica en la que el sistema inmunológico ataca las células del organismo y los tejidos, produciendo inflamación y daño debido a la unión de autoanticuerpos a las células del organismo, y al depósito de complejos antígeno-anticuerpo. El lupus puede afectar cualquier parte del organismo, aunque los sitios más frecuentes son el corazón, las articulaciones, la piel, los pulmones, los vasos sanguíneos, el hígado, los riñones y el sistema nervioso.

El término "CD38" se refiere es una glicoproteína de membrana tipo II de unos 45kDa. Su número de acceso o identificación en UniProtKB/Swiss-Prot es P28907 (SEQ ID NO: 1).

El término "anticuerpo", tal como se utiliza en la presente descripción, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con una proteína. Hay cinco isotipos o clases principales de inmunoglobulinas: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.

El término "autoanticuerpo", tal y como se utiliza en la presente descripción, se aplica a un anticuerpo que reacciona con un antígeno presente en el propio organismo de un sujeto, incluso si la reacción ocurre solo *in vitro*, y tanto si causa efectos patológicos *in vivo* como si no los produce.

El término "autoanticuerpo anti-CD38" se refiere a un autoanticuerpo capaz de reaccionar con la proteína CD38, con una variante de la proteína CD38 o con un fragmento de las mismas, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente. Preferiblemente, el término autoanticuerpos anti-CD38 se refiere a una inmunoglobulina G (IgG).

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "variante" se refiere a una proteína sustancialmente homóloga a la proteína CD38. En general, una

variante incluye adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. El término "variante" incluye también a las proteínas resultantes de modificaciones postranslacionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación.

5

Tal como aquí se utiliza, una proteína es "sustancialmente homóloga" a la proteína CD38 cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la  
10 secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, de, al menos, un 50%, típicamente de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferentemente de, al menos un 90%, más preferentemente de, al menos, un 95%, y, aún más preferentemente de, al menos, un 99%. Las secuencias homologas a la proteína CD38 pueden ser identificadas fácilmente por un experto en la  
15 materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

Preferiblemente, el "autoanticuerpo anti-CD38" es capaz de reaccionar con una variante de la proteína CD38 con SEQ ID NO: 2. Dicha variante representa el  
20 dominio extracelular de CD38 (aminoácidos 43 a 300), que representa el 86% de la secuencia aminoacídica completa de CD38 (UniProt ID: P28907; SEQ ID NO: 1).

El término "fragmento", tal y como se utiliza en la presente descripción se  
25 refiere a una porción de la proteína CD38 o de una sus variantes.

La expresión "funcionalmente equivalente", tal como aquí se utiliza, significa que la proteína o el fragmento de la proteína en cuestión mantiene esencialmente las propiedades biológicas o inmunológicas descritas en este  
30 documento. Dicha capacidad se puede determinar mediante métodos convencionales tales como los descritos en los Ejemplos que acompañan a esta descripción.

El término “diagnóstico”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a la capacidad de detectar la presencia de la enfermedad LES, cuando se aplica un método de clasificación de muestras basado en el análisis de la de la cantidad de autoanticuerpos anti-CD38 y en la comparación de la cantidad detectada con respecto a una cantidad de referencia. Esta detección tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es significativamente estadística puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, test de Student o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80%, o en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

El pronóstico es el conjunto de datos que posee la ciencia médica sobre la probabilidad de que ocurran determinadas situaciones en el transcurso de una enfermedad. Es la predicción de los sucesos que ocurrirán en el desarrollo de una enfermedad en términos estadísticos. El término “predicción”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere, pero no se limita, a los posibles cambios de una enfermedad, a la frecuencia con que se puedan producir, a la probabilidad de que un paciente responda favorable o desfavorablemente a un determinado tratamiento, y a la extensión de dichas respuestas, a la expectativa de vida cronológica, así como a la calidad de vida restante.

El término “pronóstico”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la capacidad de asignar una probabilidad de que ocurran



determinadas situaciones en el transcurso de la enfermedad del LES, cuando se aplica un método de clasificación de muestras basado en el análisis de la de la cantidad de autoanticuerpos anti-CD38 y en la comparación de la cantidad detectada con respecto a una cantidad de referencia. Esta detección tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es significativamente estadística puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, test de Student o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80%, o en al menos el 90% de los sujetos.

La determinación del grado de afección de la enfermedad o grado de afección lúpica, en un momento concreto de la enfermedad, permite el pronóstico del LES. El "índice de actividad" define el grado de afección lúpica en un momento determinado de la enfermedad, y que puede oscilar desde la remisión o actividad mínima o nula, hasta la actividad grave que comprometa la vida del paciente. Existen varios sistemas para calcular, o al menos definir, el grado de afección de LES como, por ejemplo, pero sin limitarse, BILAG (*British Lupus Isles Assessment Group Index*), SLAM (*Systemic Lupus Activity Measure*), LAI (*Lupus Activity Index*), RIFLE (*Response Index For Lupus Erythematosus SLEDAI*), SLEDAI (*Lupus Erythematosus Activity Index*) o variaciones del SLEDAI (como, por ejemplo, MEX SLEDAI, SELENA SLEDAI o SLEDAI-2K).

El Índice de Actividad Lúpica (SLEDAI, por sus siglas en inglés) es un instrumento útil para definir el tratamiento y el pronóstico del paciente con LES.

Este instrumento contiene una revisión por sistemas (examen físico, interrogatorio y pruebas de laboratorio) y determina con cierta certeza el grado de actividad o la intensidad del brote de la enfermedad lúpica en un momento concreto, que precisa manifestarse al menos 10 días antes de su realización.

5 La expresión “índice de actividad lúpica SLEDAI bajo”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un índice de actividad lúpica SLEDAI menor o igual a cinco. La expresión “índice de actividad lúpica SLEDAI alto”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un SLEDAI mayor que cinco.

10

La expresión “detección de la cantidad de autoanticuerpos anti-CD38” en la muestra obtenida, tal y como se utiliza en la descripción, hace referencia a la medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa. La medida puede ser llevada a cabo de manera  
15 directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración de autoanticuerpos anti-CD38 basada en una señal que se obtiene directamente de los autoanticuerpos y que está correlacionada directamente con el número de moléculas de autoanticuerpos anti-CD38 presentes en la muestra. Dicha señal – a la que también podemos referirnos  
20 como señal de intensidad – puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de los autoanticuerpos anti-CD38. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario (por ejemplo, un componente distinto del producto de la expresión génica) o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas  
25 celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

El término “cantidad”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa de los autoanticuerpos anti-CD38, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con los mismos o que  
30 pueda derivarse de estos. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de los autoanticuerpos anti-CD38 obtenidos mediante

medida directa, por ejemplo, valores de intensidad de espectroscopía de masas o resonancia magnética nuclear. Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en otra parte del presente documento.

El término “comparación”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación de la cantidad de los autoanticuerpos anti-CD38 de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una cantidad de autoanticuerpos anti-CD38 de una muestra de referencia deseable descrita en otra parte de la presente descripción. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. La comparación descrita en el apartado (c) de los métodos de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

El término “cantidad de referencia”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a la cantidad absoluta o relativa de los autoanticuerpos anti-CD38 que permite discriminar la presencia de la enfermedad LES o atribuir una actividad lúpica a la afección del LES. Preferiblemente, dicha cantidad de referencia define una cantidad umbral. Las cantidades de referencia o umbrales adecuadas pueden ser determinadas por el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia que puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. Más preferiblemente, la cantidad umbral puede derivarse de los límites de distribución normal de una cantidad fisiológica encontrada en una población de sujetos control. Dicha cantidad umbral fisiológica puede ser determinada por varias técnicas bien conocidas, como por ejemplo, el cálculo de la media de la cantidad de anticuerpos anti-CD38 en una población de sujetos control determinado mediante el método de la presente invención.

En una realización preferida, la detección de la cantidad de los autoanticuerpos se realiza mediante un inmunoensayo. El término "inmunoensayo", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a cualquier técnica analítica que se basa en la reacción de la conjugación de los autoanticuerpos anti-CD38 de la muestra obtenida con la proteína CD38, con una variante de la proteína CD38 o con un fragmento de las mismas. En una realización preferida, el "autoanticuerpo anti-CD38" es capaz de reaccionar con el dominio extracelular de CD38 (SEQ ID NO: 2). En una realización más preferida, el anticuerpo anti-CD38 es una IgG.

10

Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: *immunoblot*, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, o *chips* de proteína.

15

En una realización preferida, el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). El ELISA se basa en la premisa de que un inmunorreactivo (antígeno de la muestra biológica o anticuerpo) puede ser inmovilizado en un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario que puede unirse a un compuesto marcador. Existen diferentes tipos de ELISA: ELISA directo, ELISA indirecto o ELISA sándwich.

En una realización más preferida de estos aspectos de la presente invención, el ELISA es un ELISA indirecto, que comprende los siguientes pasos: (a) recubrir un soporte sólido con la proteína CD38, una variante de la proteína CD38 o un fragmento de las mismas; (b) incubar el soporte recubierto del paso (a) con una muestra biológica obtenida del sujeto en condiciones que permitan la formación de un inmunocomplejo de los autoanticuerpos anti-CD38 presentes en la muestra con los antígenos de la proteína CD38, de su variante o de su fragmento; y (c) incubar con un anticuerpo secundario, que reconoce a los autoanticuerpos anti-CD38, conjugado o unido a un compuesto marcador.

25  
30

El término "compuesto marcador", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de dar lugar a una señal cromogénica, fluorogénica, radiactiva y/o quimioluminiscente que permita la detección y cuantificación de la cantidad los autoanticuerpos anti-CD38. El compuesto marcador se selecciona de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa. Este compuesto marcador puede unirse al anticuerpo directamente, o a través de otro compuesto. Algunos ejemplos de compuestos marcadores que se unen directamente son, pero sin limitarse, enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, isótopos radiactivos como  $^{33}\text{P}$  o  $^{35}\text{S}$ , fluorocromos como fluoresceína o partículas metálicas, para su detección directa mediante colorimetría, auto-radiografía, fluorimetría, o metalografía respectivamente.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para disminuir la cantidad autoanticuerpos anti-CD38 de una muestra biológica aislada obtenida de un sujeto que comprende poner en contacto dicha muestra con un soporte sólido recubierto con la proteína CD38, una variante de CD38 o un fragmento derivado de la misma. La muestra biológica aislada se pone en contacto con el soporte sólido en condiciones que permitan la formación de un inmunocomplejo de los autoanticuerpos anti-CD38 presentes en la muestra con los antígenos de la proteína CD38, de su variante o de su fragmento, de manera que se consigue disminuir o eliminar la presencia de autoanticuerpos en la muestra.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica aislada se pone en contacto con el soporte sólido durante un procedimiento de plasmaféresis en un sujeto.

El término "plasmaféresis", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a un procedimiento que involucra la filtración de la sangre para separar el plasma de las células sanguíneas. La cantidad de plasma eliminado tiene que ser reemplazada por nuevo plasma para poder regresar la sangre al

cuerpo. Puede utilizarse como técnica de obtención de plasma de donante, con fines transfusionales, o como plasmaféresis terapéutica. La “plasmaféresis terapéutica” o “recambio plasmático”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la separación y eliminación del enfermo de un volumen  
5 igual o superior a su volumen plasmático, con el fin de disminuir o eliminar un constituyente plasmático anormal o aportar un componente plasmático normal, en el que el enfermo sea deficitario. En la presente invención, el recambio plasmático se realiza con el fin de disminuir o eliminar los autoanticuerpos anti-CD38 mediante el método anteriormente descrito.

10

El término “muestra biológica aislada”, tal y como se utiliza en la descripción se refiere, pero no se limita, a tejidos y/o fluidos biológicos de un sujeto, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. Preferiblemente, la muestra biológica aislada es un fluido biológico,  
15 como por ejemplo, pero sin limitarse, sangre, plasma o suero sanguíneo. Más preferiblemente, el fluido biológico es el plasma sanguíneo o suero sanguíneo. El término “sujeto”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo que comprende los elementos necesarios para llevar a cabo los métodos de la presente invención.

Preferiblemente, el kit de la presente invención comprende los elementos  
25 necesarios para:

- a) analizar la cantidad de autoanticuerpos en la muestra obtenida en el paso (a) y
- b) comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de  
30 referencia.

Dicho kit puede contener todos aquellos reactivos necesarios para analizar la cantidad autoanticuerpos por medio de cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento como, por ejemplo, pero sin limitarse, a la proteína CD38, una variante de la proteína CD38 o un fragmento de las mismas purificados, anticuerpos capaces de reconocer específicamente a los autoanticuerpos anti-CD38, o controles positivos y/o negativos. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20

## DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

**Figura 1.** Muestra el aumento de los niveles de autoanticuerpos anti-CD38 de la clase IgG (anti-CD38 IgG) en pacientes con LES. A, Niveles de autoanticuerpos anti-CD38 IgG en pacientes con LES (círculos negros), controles (círculos blancos), pacientes con LES con un SLEDAI menor o igual a cinco (rombos blancos) y pacientes con LES con un SLEDAI de 6 a 20 (triángulos negros). B, Curva ROC para los anticuerpos anti-CD38 IgG de pacientes con LES vs controles sanos. En el eje de las Y se representa en % la tasa de resultados verdaderamente positivos (sensibilidad) y en el eje de las X la tasa de falsos positivos (100-Especificidad) para todo el rango de valores

30

límites (cut-offs) posibles. C, Niveles de autoanticuerpos anti-CD38 IgG en LES vs controles sanos para un valor límite de  $> 0.76$  ODU. D, Curva ROC de los datos de la figura C. E, Niveles de autoanticuerpos anti-CD38 IgG en LES vs controles sanos para un valor límite  $< 0.76$ . F, Curvas ROC de los datos de la figura E.

**Figura 2.** Muestra los niveles de autoanticuerpos anti-CD38 de la clase IgM (anti-CD38 IgM) en pacientes con LES. A, Niveles de autoanticuerpos anti-CD38 de la clase IgM en pacientes con LES (círculos negros), controles sanos (círculos blancos), pacientes con LES y SLEDAI 0-5 (rombos blancos), y pacientes con LES y SLEDAI 6-20 (triángulos negros). B, Curva ROC para los anticuerpos anti-CD38 IgM de pacientes con LES versus controles sanos.

**Figura 3A y 3B.** Muestra la comparación de los niveles de citoquinas de pacientes con LES con actividad SLEDAI 0-5 (círculos negros), con pacientes con LES y actividad SLEDAI 6-20 (rombos negros), y con controles sanos (círculos blancos).

**Figura 4.** Muestra el aumento de la expresión de CD38 en diferentes estirpes celulares en pacientes con LES. A, Porcentaje de linfocitos T CD38+ en pacientes con LES (círculos negros), controles sanos (círculos blancos), pacientes con LES y SLEDAI = 0 (rombos negros), y pacientes con LES y SLEDAI entre 1 y 20 (rombos blancos). B, Porcentaje de linfocitos B CD38+ en las mismas muestras de pacientes y controles que en A. C, Porcentaje de células NK en las mismas muestras de pacientes y controles que en A.

**Figura 5.** Muestra la ausencia de correlación entre los niveles de anticuerpos anti-CD38 IgG y el porcentaje de linfocitos T CD38+ en pacientes con LES. En el eje de las X se representa el % de linfocitos T CD38+ y en el eje de las Y se representan los niveles de anticuerpos anti-CD38 IgG medidos por ELISA.



**Figura 6.** Muestra el efecto del plasma de pacientes con LES en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de linfocitos T Jurkat. A, Cinética de la liberación de calcio intracelular expresado como Ratio 340/380 (eje de las Y) en células Jurkat incubadas con los reactivos indicados en la leyenda del panel durante el período de tiempo indicado en el eje de las X (tiempo en minutos). B, Comparación de la capacidad de los plasmas de pacientes con LES (círculos negros), o de los plasmas de controles sanos (círculos blancos) para inducir la liberación de calcio intracelular de células Jurkat. Se comparan las Ratios 340/380 obtenidas a los 6 min o a los 19.5 minutos después de añadir los plasmas. C, Comparación de la capacidad de los plasmas anti-CD38+ (círculos negros) versus plasmas anti-CD38- (círculos blancos) de pacientes con LES para inducir la liberación de calcio intracelular de células Jurkat.

## 15 EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

### 25 EJEMPLO 1.

#### PACIENTES Y MÉTODOS.

##### *Selección de pacientes.*

30 Se seleccionaron un total de 69 pacientes con LES que atendieron de forma consecutiva el hospital de día de la Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas del Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada. Todos los pacientes fueron clasificados como LES siguiendo los criterios de la Sociedad

Americana de Reumatología (Bombardier et al. 1992 Arthritis Rheum, 35, 630-640). Se midió la actividad de la enfermedad siguiendo el SLE Disease Activity Index (SLEDAI) (Bombardier et al. 1992 Arthritis Rheum, 35, 630-640). Un total de 71 individuos controles (43 mujeres y 28 hombres) fueron seleccionados en el banco de sangre local. Aunque en los ejemplos Una muestra de sangre de cada paciente fue tomada en tubos BD-Vacutainer, el plasma y las células mononucleares de sangre periférica fueron separadas a continuación siguiendo protocolos estándar (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich). Las muestras de plasma fueron congeladas inmediatamente a -80°C hasta que utilizaron en los ensayos descritos más abajo. Cada paciente dio el informe consentido y el estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital San Cecilio de Granada.

#### ***Análisis de los anticuerpos anti-CD38 por un inmunoensayo enzimático.***

En el ensayo inmunoenzimático (ELISA) se utilizó como antígeno la proteína recombinante GST-CD38 con una cola de histidina. Esta proteína representa el dominio extracelular de CD38 y se expresó en el sistema de baculovirus/células de insecto descrito anteriormente (Khoo et al. 2005... Protein Expr Purif, 40, 396-403.). Los niveles de anticuerpos anti-CD38 de la clase IgG o IgM fueron medidos mediante ELISA. Para ello la proteína de fusión CD38-GST se añadió a placas de poliestireno de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Denmark) diluida en una solución de recubrimiento (0,05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6) y se incubaron durante 16 horas a 4°C. Después de esta incubación las placas se lavaban dos veces con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía 0,1% de Tween 20 (PBS/Tween) y los pocillos eran bloqueados durante dos horas con una solución que contenía 5% de albúmina bovina (BSA) en PBS. Las muestras de plasma se diluyeron al 1:4 en PBS/Tween y 100 µl de esta dilución se añadía a cada pocillo y se incubaba durante 2 horas a 37°C. Transcurrido ese tiempo se lavaban las placas cuatro veces con PBS/Tween, y a continuación se añadía un anticuerpo anti-IgG humana unido a peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se incubaba durante una 1h. Después se lavaban las placas 6 veces con PBS/Tween y se añadían

100  $\mu$ l del sustrato dihidrocloro de o-fenildiamina (OPD) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La reacción se paró añadiendo ácido sulfúrico 0.5M y la absorbancia se midió a 450 nm utilizando el lector de placas VersaMax (Molecular Devices, Chicago, IL). Los resultados se expresaron en unidades de densidad óptica (ODU). Para la detección de los anticuerpos anti-CD38 de la clase IgM, se incubaron los plasmas con una IgG de cabra anti-IgM humana seguido de la incubación con un anticuerpo hecho en conejo específico contra IgG de cabra y conjugado a peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Los siguientes pasos fueron iguales que los descritos más arriba. La validación de ambos ensayos se realizó en el laboratorio de la siguiente forma: para determinar la variación interensayo en cada análisis se midieron los niveles de anticuerpo de dos plasmas de controles sanos y dos de pacientes con LES siendo siempre dicha variación menor del 15%. La variación intraensayo de muestras por triplicado fue siempre menor o igual al 5%. Como control positivo del ensayo se utilizó H-170 que es un anticuerpo policlonal hecho en conejo que reconoce específicamente CD38 humano (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA). Este anticuerpo se añadía a pocillos recubiertos de CD38-GST y después se lavaban las placas y se procedía a la incubación con un anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo hecho en cabra) conjugado a peroxidasa de rábano (Promega Co., Madison, WI).

### ***Producción de citoquinas.***

Se midieron simultáneamente 10 citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  en el plasma de pacientes con LES o de personas sanas siguiendo las indicaciones del fabricante (The Bio-Plex Precision Pro Human Cytokine 10-Plex kit assay, Bio-Rad, Hercules, CA):

### ***Análisis de Ca<sup>2+</sup>.***

30

Los cambios en la concentración de calcio intracelular se midieron utilizando el protocolo descrito anteriormente (Roach et al. 2008. J Biol Chem, 283, 17351-17361).

#### 5 ***Análisis por citometría de flujo de los PBMC o los linfocitos T purificados.***

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o los linfocitos T purificados fueron analizadas por citometría de flujo para determinar el nivel de expresión de CD3, CD4, CD8, CD38, CD19 y CD56, ya sea uno a uno o  
10 mediante doble marcaje utilizando FITC-, o PE-labeled anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD38, anti-CD19, y anti-CD56 mAbs en las condiciones relevantes. Las compensaciones para evitar solapamientos fueron ajustadas utilizando PBMC o linfocitos T. Anticuerpos no relevantes pero de la misma subclase que la de los anticuerpos específicos fueron utilizados para  
15 determinar el fondo de las medidas. Los PBMC y los linfocitos fueron seleccionados dependiendo de sus características de tamaño y complejidad (Munoz et al. 2003. J Biol Chem, 278, 50791-50802; Zubiaur et al. 1997. J Immunol, 159, 193-205). El análisis de las muestras se realizó por inmunofluorescencia de dos colores utilizando el citómetro de flujo (FACScan  
20 flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA), utilizand el software de CellQuest Pro (BD Biosciences), y de FlowJo (Tree Star, Inc. San Carlos, CA).

#### ***Análisis estadístico.***

25 Los valores fueron expresados como media  $\pm$  desviación estándar (SD), o como medianas dependiendo del tipo de distribución de los datos. Las comparaciones de las medias de dos grupos diferentes se realizó mediante el Student's *t* test para variables que se distribuyen normalmente. En el caso de variables que no se distribuyen normalmente se utilizó el Mann-Whitney *U* test  
30 que compara medianas en vez de medias. Para determinar el poder discriminativo de los autoanticuerpos anti-CD38 (IgG o IgM) para distinguir entre controles y pacientes con lupus se utilizó el análisis de las curvas ROC

(Receiver Operating Characteristic). Las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas para una  $P \leq 0,05$ . El análisis de los datos se realizó mediante el software GraphPad Prism version 4.03 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

5

## **RESULTADOS.**

No se utilizó ningún criterio de exclusión para seleccionar los pacientes para poder obtener una muestra heterogénea y representativa de un amplio espectro de fenotipos clínicos y de laboratorio. Un total de 69 pacientes con LES fueron reclutados. La media de edad de los pacientes con LES era de  $37,2 \pm 11,3$  años. 93,4% de las pacientes con LES eran mujeres. Todos los pacientes y controles eran Caucasianos. La media de la duración de la enfermedad era de  $5,9 \pm 5,0$  años. Los pacientes con LES tenían una media de SLEDAI de 4 (rango de 0 a 24).

15

### ***Aumento de los niveles de autoanticuerpos anti-CD38 IgG en el plasma de pacientes con LES...***

20

La Figura 1A muestra la distribución de los anticuerpos anti-CD38 IgG en los controles sanos y los pacientes con LES. El valor medio de los anti-CD38 IgG de los pacientes con LES estaba significativamente aumentada respecto a la media de los controles sanos ( $P = 0,0071$ ,  $t$ -test). A continuación los pacientes con LES fueron separados en dos grupos SLEDAI-bajo (0-5), y SLEDAI-alto (6-20). El índice SLEDAI es un indicador numérico de la actividad global de la enfermedad (Bombardier et al. 1992 Arthritis Rheum, 35, 630-640). El valor medio de los anti-CD38 IgG era mayor en los pacientes con SLEDAI-alto que en los pacientes con SLEDAI bajo ( $1,12 \pm 0,21$  vs  $0,94 \pm 0,05$ ), aunque en ambos grupos estos valores eran significativamente más altos que el de la población control ( $0,80 \pm 0,02$ ;  $P = 0,0105$ , and  $P = 0,0047$ , respectivamente,  $t$ -test).

25

30

Para determinar el poder discriminativo de los autoanticuerpos anti-CD38 IgG para distinguir entre controles y pacientes con lupus se utilizó el análisis de las curvas ROC (Receiver Operating Characteristic. Como se puede observar en la Fig. 1B, se observó que el test puede distinguir de forma significativa entre resultados verdaderamente positivos (eje de las Y) y falsos positivos (eje de las X) (el área dentro de la curva ROC = 0,6056,  $P = 0,03045$ ). Sin embargo, la curva ROC indicaba que la precisión en esta distinción disminuía a sensibilidades mayor del 60%, que corresponden a valores de anticuerpos anti-CD38 IgG de 0,76 ODU o menores (Fig 1B). De hecho, si se clasificaban los resultados en dos grupos diferentes de acuerdo con un valor límite de 0,76 ODU (Fig. 1C and Fig. 1E), la precisión del test en el grupo  $> 0,76$  ODU aumentaba de forma muy significativa ya sea respecto al grupo total (comparar la curva ROC de la Fig. 1D con la curva ROC curve de la Fig. 1B), o respecto al grupo  $< 0,76$  ODU (Fig. 1D vs Fig. 1F). En el grupo  $> 0,76$  ODU, el área dentro de la curva ROC curve era de 0.7047, ( $P = 0.001758$ ), mientras que en el grupo  $< 0,76$  ODU, el área dentro de la curva ROC era 0,5357 ( $P = 0.6329$ ). Además, en el subgrupo  $> 0,76$  ODU el valor medio de los anti-CD38 IgG de los pacientes con LES era significativamente mayor que la de los grupo de controles ( $P = 0,0028$ , *t*-test). Por el contrario, en el subgrupo  $< 0,76$  ODU los valores medios de los anti-CD38 IgG eran similares entre pacientes y controles. Si establecemos un valor límite de 1,46 ODU, correspondiente a la media + 3 desviaciones estándar del grupo control, se observa que el 14,6% de los pacientes con LES tiene autoanticuerpos anti-CD38 IgG versus 0% en el grupo control ( $P = 0,0261$ , Fisher's exact test).

25

En la Fig. 2A se muestra la distribución de los valores de autoanticuerpos anti-CD38 IgM en los controles sanos y en los pacientes con LES. Como se puede observar, no había diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de los pacientes con LES respecto a los de los controles ( $P = 0,5568$ ). Si los pacientes eran clasificados en función de la actividad de la enfermedad si se observaron diferencias entre el grupo con SLEDAI-alto respecto al grupo control ( $0,64 \pm 0.05$  vs  $0,55 \pm 0.02$ ) aunque no fueran estadísticamente

30

significativas por muy pequeño margen ( $P = 0.0599$ ). Sin embargo, la media del grupo SLEDAI-bajo era idéntica a la del grupo control ( $0.55 \pm 0.02$ ).

5 Tampoco se observó que los anticuerpos anti-CD38 IgM tuvieran un valor suficiente para poder distinguir pacientes de controles utilizando el análisis ROC (Area = 0,5178,  $P = 0,7169$ ) (Fig. 2B). Si establecíamos un valor límite de normalidad de 1,02 ODU (media + 3 desviaciones estándar del grupo control), no había ningún paciente que sobrepasara dicho límite.

10 ***Correlación positiva entre los niveles de anticuerpos anti-CD38 IgG y la concentración en plasma de citoquinas en pacientes con LES.***

La importancia de las citoquinas en la patogénesis de la nefritis lúpica ha sido establecida utilizando modelos espontáneos de LES en ratón (Kelley y  
15 Wuthrich. 1999. Semin Nephrol, 19, 57-66). Un estudio previo demostró que existía una asociación entre la actividad de la enfermedad y la concentración elevada de citoquinas como interleuquina-(IL)-1, IL-2, IL-6, interferon-gamma (IFN-gamma) y tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) (Robak et al. 1996. Przegł Lek, 53, 623-626). Nosotros hemos utilizado la tecnología Multiplex para  
20 medir simultáneamente los niveles de 10 citoquinas diferentes en el plasma de 49 pacientes con LES y 18 controles sanos. Todos los valores se expresaron como medianas con los percentiles 25 y 75 y la valoración estadística se realizó utilizando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Como se muestra en la Tabla I, en pacientes con LES había un incremento significativo de 9 de las  
25 10 citoquinas testadas respecto a los valores de los controles sanos.

**Tabla I.** Concentración elevada de citoquinas en plasmas de pacientes con LES respecto a controles sanos. \* pg/ml

Citoquina	LES (n=49)			Controles (n=18)			Valor de la <i>P</i>
	Mediana*	25% percentil	75% percentil	Mediana*	25% percentil	75% percentil	
IL-1 $\beta$	1,13	0,51	2,75	0,46	0	0,86	0,0026
IL-2	14,18	0	26,73	0,02	0	13,60	0,0424
IL-4	1,66	0,66	3,42	0,78	0	1,35	0,0069
IL-5	0	0	3,20	0	0	0	0,3778
IL-6	12,50	5,56	44,68	0,66	0	7,20	0,0012
IL-10	6,77	2,85	20,81	2,11	0	5,77	0,0111
IL-12	2,17	0,35	6,80	0,45	0	2,08	0,0161
IL-13	9,28	3,57	16,73	3,02	0	7,33	0,0117
IFN- $\gamma$	1,51	0,50	5,04	0,40	0	1,65	0,0302
TNF- $\alpha$	2,45	1,15	6,84	0,71	0	2,26	0,0177

5 Además observamos una correlación positiva muy fuerte entre el incremento de la concentración de estas citoquinas y los niveles de anticuerpos anti-CD38 IgG (Tabla II). También observamos una buena correlación de la concentración de alguna de las citoquinas con la actividad de la enfermedad medida por el SLEDAI (Fig. 3).

10

**Tabla II.** El incremento en los niveles plasmáticos de citoquinas en pacientes con LES está relacionado con los niveles de autoanticuerpos anti-CD38. Análisis estadístico de los 10 analitos que mostraban una correlación positiva con los niveles de anticuerpos anti-CD38 en pacientes con LES (esta correlación no se observó al hacer el mismo tipo de análisis en un grupo de

15 controles sanos (datos no mostrados en la tabla)). Los valores de la *P* se obtuvieron mediante el test de Pearson. Por el contrario, no se observó ninguna correlación entre el % de linfocitos T CD38+ y los niveles de anticuerpos anti-CD38.

20



Analito	Anticuerpos anti-CD38 IgG	Valor de la <i>P</i>	Resumen del valor de la <i>P</i>
IL-1 $\beta$	0,6367	0,0019	**
IL-2	0,5807	0,0058	**
IL-4	0,6696	0,0009	***
IL-5	0,7551	0,0001	***
IL-6	0,6466	0,0021	**
IL-10	0,6700	0,0009	***
IL-12	0,6643	0,0010	**
IL-13	0,6116	0,0032	**
IFN- $\gamma$	0,7064	0,0003	***
TNF- $\alpha$	0,6383	0,0018	**
% de linfocitos T CD38 <sup>+</sup>	0,0145	0,9284	No significativo

***Aumento en la expresión de CD38 en los linfocitos T de pacientes con LES.***

- 5 Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con LES y de controles sanos fueron analizadas por citometría de flujo para determinar la expresión de CD38 en la superficie celular de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>), linfocitos B (CD19<sup>+</sup>), y células NK (CD56<sup>+</sup>). En los pacientes con LES se observó un aumento significativo del porcentaje de linfocitos T que eran CD38<sup>+</sup> respecto a los valores obtenidos en controles sanos (3111 $\pm$ 3.4 vs 13 $\pm$ 1,2, Mean $\pm$ SEM, *P* = 0.0005) (Fig. 4A). Si los pacientes con LES eran separados en dos grupos, dependiendo de su SLEDAI (SLEDAI = 0 and SLEDAI 1-20) las diferencias en la expresión de CD38 respecto a los controles se mantenía (29,4 $\pm$ 5.1, *P* = 0,0019; y 32,4 $\pm$ 4,7, *P* = 0.0008, respectivamente). Si consideráramos que la proporción de CD38<sup>+</sup> considerada normal era 24,65% establecida mediante un análisis ROC (Área = 0,8014, *P* = 0.0008), 46% de los pacientes LES sin detectable actividad de la enfermedad (SLEDAI = 0), y 67% de los pacientes con LES que manifestaban algún síntoma de enfermedad (SLEDA 1-20) mostraban aumentos en la proporción de linfocitos T CD38<sup>+</sup> versus 0% en linfocitos T normales. De igual forma, las diferencias de expresión de CD38 también se observaban en los linfocitos B y células NK de estos pacientes respecto a controles sanos (Fig. 4B and 4C). Los datos también indicaban que existía una correlación muy buena en la expresión de CD38 en linfocitos T

respecto a la de los linfocitos B ( $r = 0,5481$ ,  $P = 0,0008$ , Pearson's correlation) y a la de las células NK ( $r = 0,46$ ,  $P = 0,0062$ , Pearson's correlation).

5 ***Correlación negativa entre los niveles de los anticuerpos anti-CD38 IgG y la expresión de CD38 en los linfocitos T en pacientes con LES.***

En un subgrupo representativo de pacientes con LES se comparó los niveles de anticuerpos anti-CD38 IgG con la proporción de linfocitos T CD38+. No existía correlación positiva entre ambos parámetros ( $r = 0,0145$ ,  $P = 0,9284$ ,  
10 Pearson's correlation). De hecho, como muestra la Fig. 5 dichos parámetros parecían ser mutuamente exclusivos, en el sentido que aquellos pacientes con niveles elevados de anticuerpos anti-CD38 IgG tenían una proporción baja de linfocitos T CD38+ y viceversa aquellos pacientes con una proporción relativamente elevada de linfocitos T CD38+ tenían niveles de anticuerpos anti-  
15 CD38 IgG muy bajos. Dado que los autoanticuerpos anti-CD38 IgG podrían unirse a la superficie celular de las células circulantes CD38+, estos autoanticuerpos podrían saturar los sitios de unión a CD38 en los linfocitos T de forma que no fueran accesibles a los anticuerpos anti-CD38 utilizados en la citometría de flujo. Alternativamente, la expresión de CD38 en la superficie de  
20 los linfocitos T podría disminuir por internalización del mismo causado por los altos niveles de autoanticuerpos anti-CD38 presentes en el plasma de algunos pacientes con LES. Para testar esta última posibilidad incubamos células Jurkat (es una línea de linfocitos T que son CD38+) con plasmas de pacientes con LES y con altos niveles de anticuerpos anti-CD38 y no observamos  
25 disminuciones significativas en la expresión de CD38 en la superficie de las células Jurkat (datos no mostrados).

30 ***Efecto del plasma de pacientes con LES en la liberación de  $Ca^{2+}$  por células Jurkat.***

Para determinar si la presencia de anticuerpos anti-CD38 IgG tenía algún efecto funcional en los linfocitos T, se realizaron los siguientes experimentos

utilizando linfocitos T de la línea Jurkat. En la Fig. 6A se muestra el perfil de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por el plasma de un paciente con LES respecto a un plasma de un control sano. El plasma del paciente con LES mostraba actividad agonista como se demuestra por el aumento en la concentración de calcio intracelular  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a lo largo del tiempo. La cinética de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por este plasma del paciente con LES es muy diferente a la provocada por el anticuerpo monoclonal anti-CD3 OKT3. Inmediatamente después de añadir el plasma del paciente no se observa la característica subida en los niveles de calcio intracelular que si ocurre con OKT3. En contraste, el plasma del control sano no inducía liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en las células Jurkat.

Estos mismos experimentos se realizaron con un grupo de pacientes y controles y se determinó la ratio de la luz emitida respecto a la excitación a 340 nm/380 nm (340/380 ratio) a los 6 min y a los 19,5 min después del inicio de la incubación con los plasmas de los diferentes individuos. Como se muestra en la fig. 6B, a los 19,5 min la media de la ratio 340/380 era significativamente más alta en el grupo de plasmas de pacientes que en el grupo de plasmas de controles sanos. Por el contrario a los 6 min, las diferencias no eran estadísticamente significativas.

Si se establecía un límite de normalidad de 1,1 (media + dos desviaciones estándar de las ratios 340/380 ratio a los 19,5 min después de la incubación con plasmas de 7 controles sanos diferentes. Con ese valor límite, el 50% de los plasmas de pacientes con LES inducían incrementos en la liberación de calcio en células Jurkat T ( $P = 0,0044$ ). También se evaluó si había una mayor proporción de plasmas agonistas en los que eran anti-CD38  $\text{IgG}^+$  respecto a los anti-CD38  $\text{IgG}^-$ . Como se muestra en la Fig. 6C, las medias de las ratios 340/380 entre ambos grupos no eran estadísticamente significativas.

30

## **REIVINDICACIONES**

1. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico o el pronóstico del Lupus Eritematoso Sistémico (LES) que comprende:
- 5
- a) obtención de una muestra biológica aislada de un sujeto,
  - b) análisis de la cantidad de autoanticuerpos anti-CD38 en la muestra obtenida en el paso (a); y
  - c) comparación de la cantidad detectada en el paso (b) con una
- 10 cantidad de referencia.
2. Método de diagnóstico del LES según la reivindicación 1, que además comprende un paso (d) donde una cantidad de autoanticuerpos anti-CD38 detectada en el paso (b) mayor que la cantidad de referencia con la que se
- 15 compara en el paso (c) es indicativa de la presencia de un LES.
3. Método de pronóstico del LES según la reivindicación 1, que además comprende un paso (d) donde una cantidad de autoanticuerpos anti-CD38 detectada en el paso (b) mayor que la cantidad de referencia con la que se
- 20 compara en el paso (c) permite asignar al sujeto un índice de actividad lúpica.
4. Método de pronóstico del LES según la reivindicación 1, que además comprende un paso (d) donde una cantidad de autoanticuerpos anti-CD38 detectada en el paso (b) mayor que la cantidad de referencia con la que se
- 25 compara en el paso (c) permite asignar al sujeto un índice de actividad lúpica SLEDAI alto.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde el análisis de la cantidad de autoanticuerpos anti-CD38 en la muestra obtenida en (a) se
- 30 lleva a cabo mediante inmunoensayo.

6. Método según la reivindicación 5 donde el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).
7. Método según la reivindicación 6 donde el ELISA emplea la proteína CD38, una variante o un fragmento de las mismas unido a un sustrato sólido.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde el anticuerpo anti-CD38 es una inmunoglobulina G (IgG).
9. Método para disminuir la cantidad autoanticuerpos anti-CD38 de una muestra biológica aislada que comprende poner en contacto dicha muestra con un soporte sólido recubierto con la proteína CD38, una variante de CD38 o un fragmento derivado de la misma.
10. Método según la reivindicación 9 donde la muestra biológica aislada se pone en contacto con el soporte sólido durante un procedimiento de plasmaféresis en un sujeto.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde la muestra biológica es un fluido biológico.
12. Método según la reivindicación 11 donde el fluido biológico es plasma sanguíneo o suero sanguíneo.
13. Kit que comprende los elementos necesarios para llevar a cabo los métodos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Kit según la reivindicación 13 que comprende los elementos necesarios para:
- a) analizar la cantidad de autoanticuerpos anti-CD38 en la muestra obtenida en el paso (a) y

- b) comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

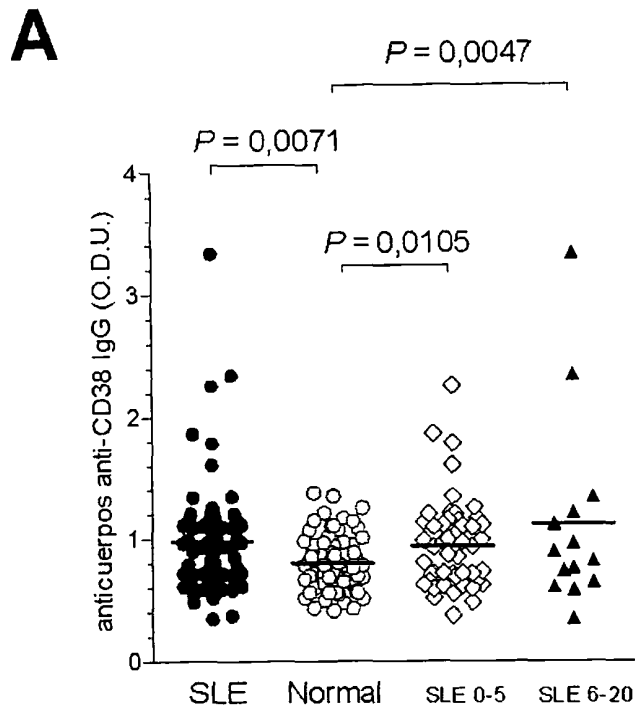


FIG. 1A

**B**

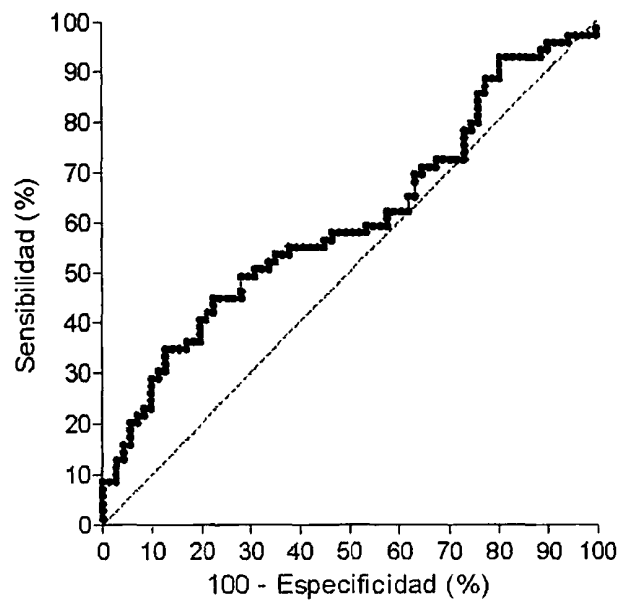


FIG. 1B

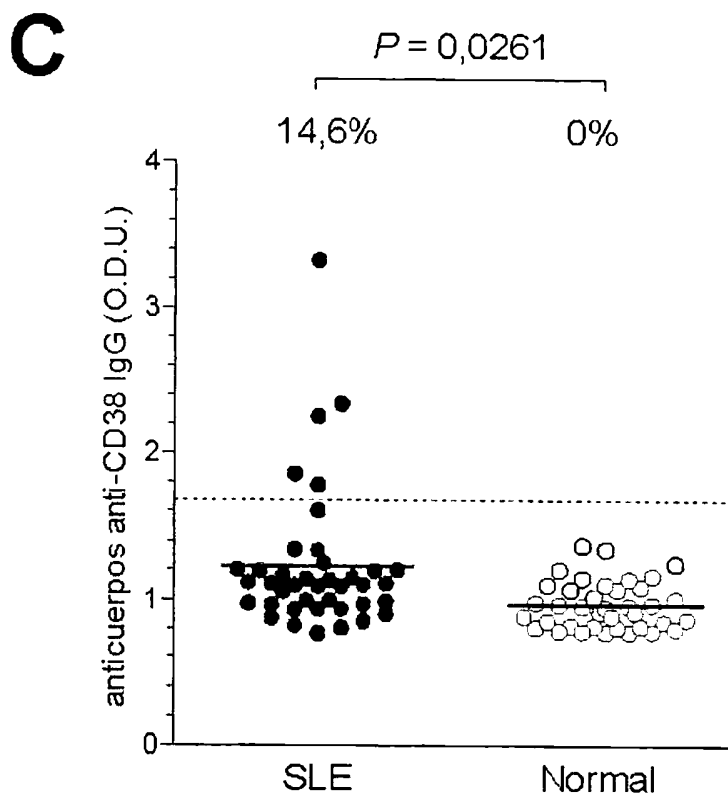


FIG. 1C

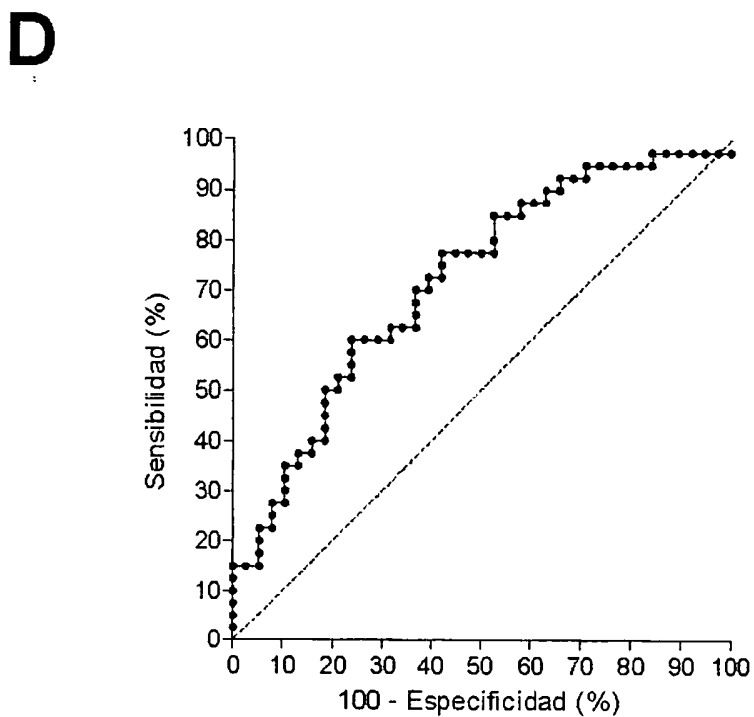


FIG. 1D



**E**

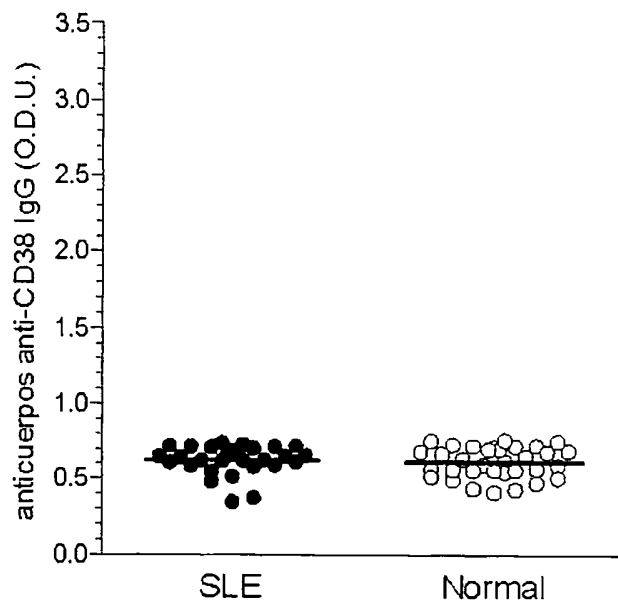


FIG. 1E

**F**

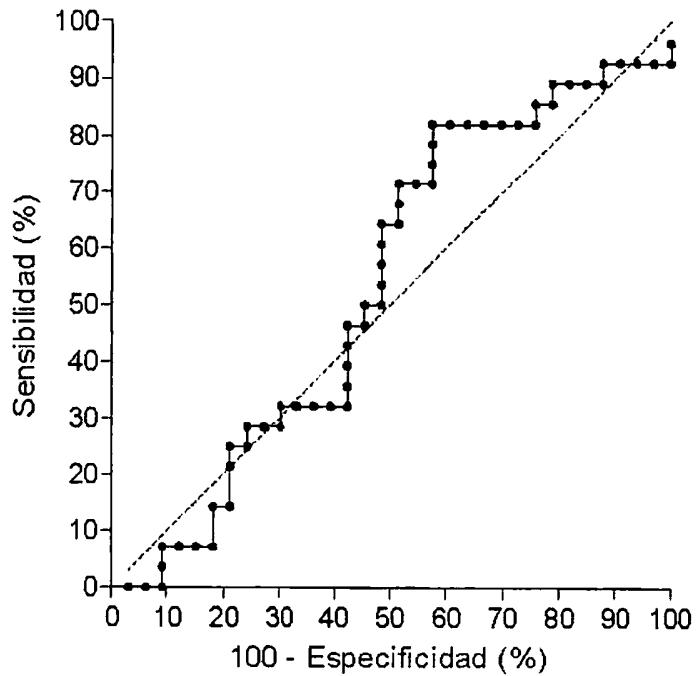


FIG. 1F

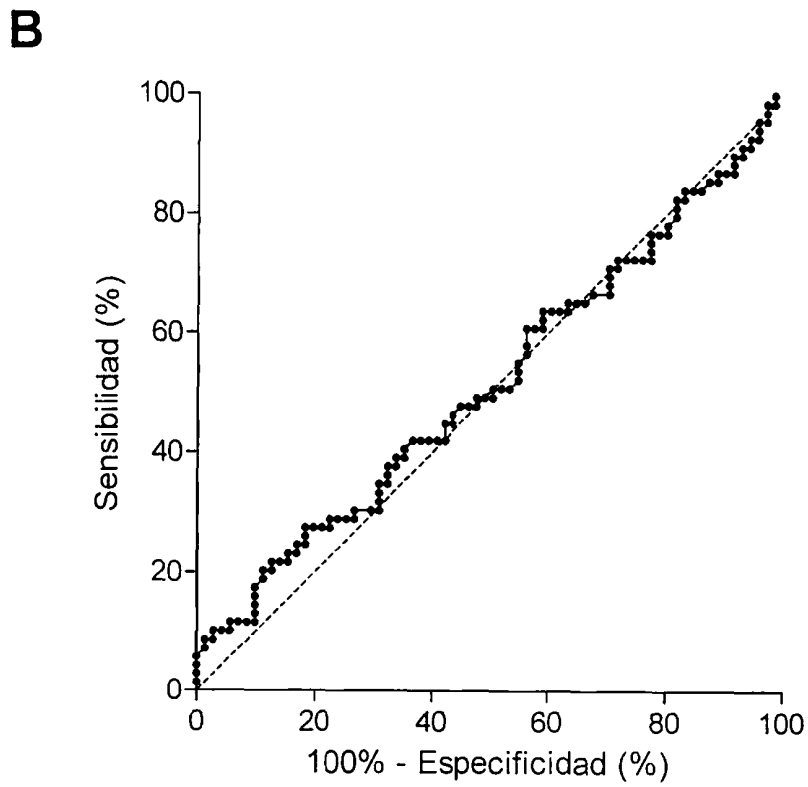
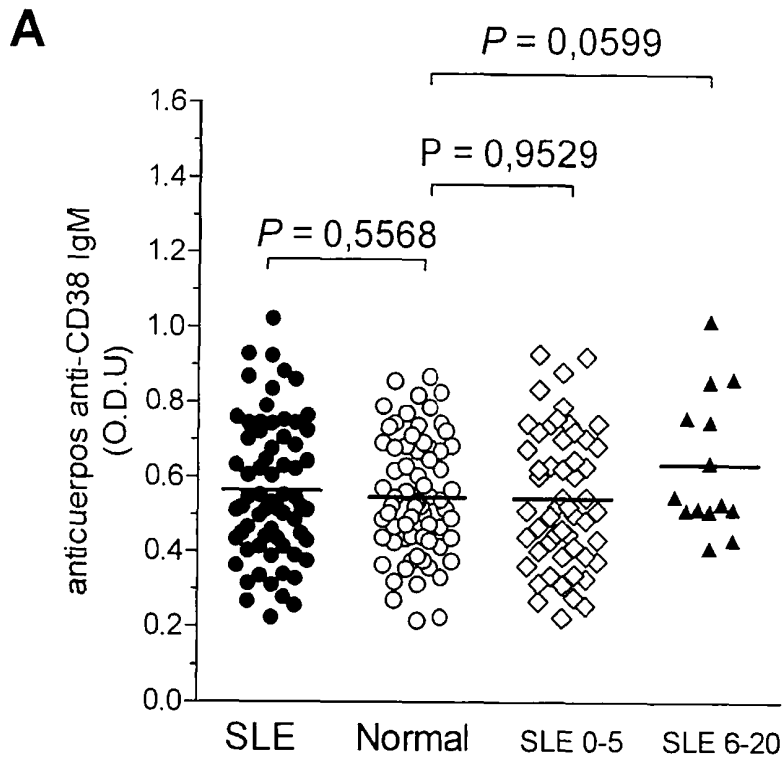


FIG.2

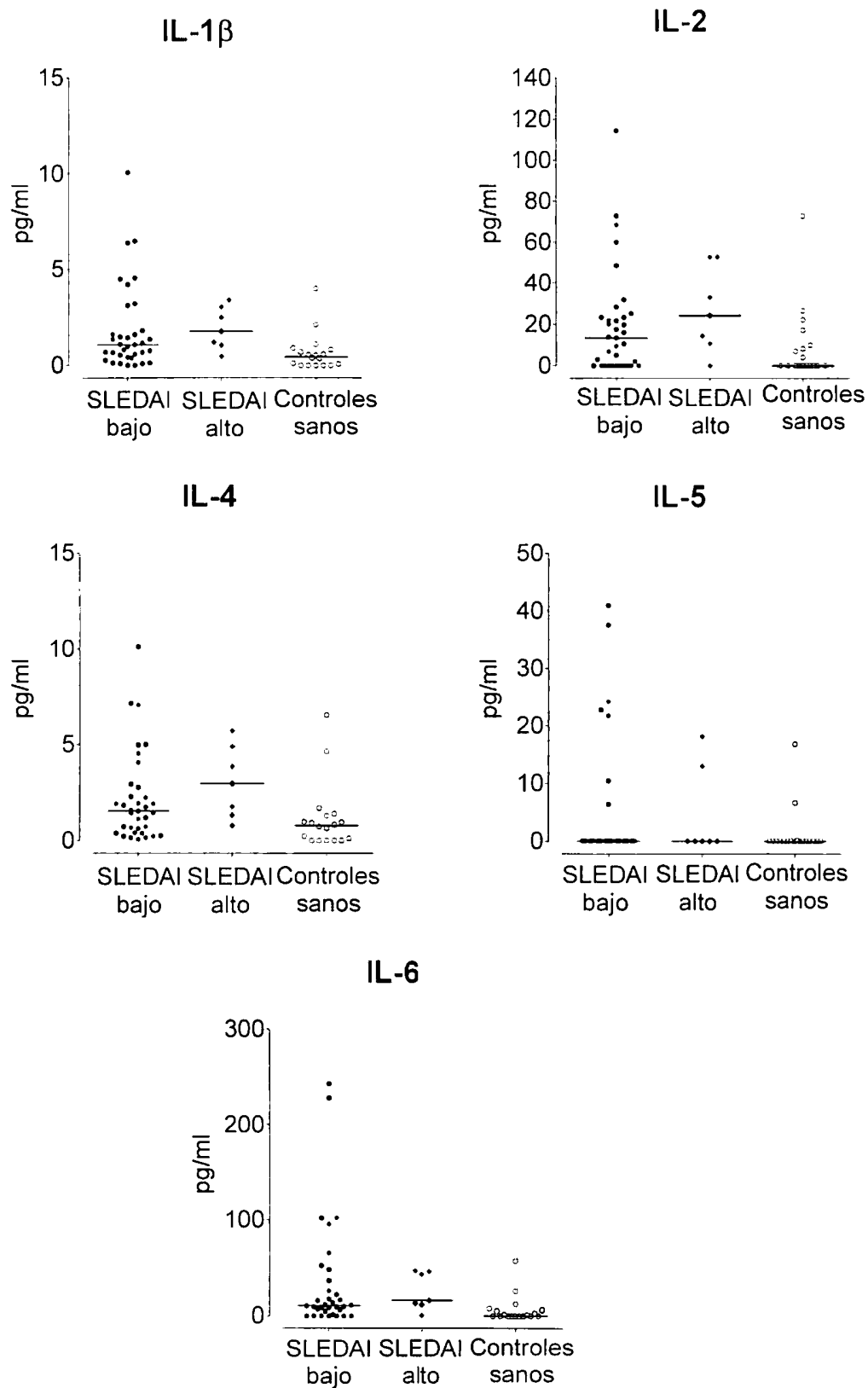


FIG. 3A

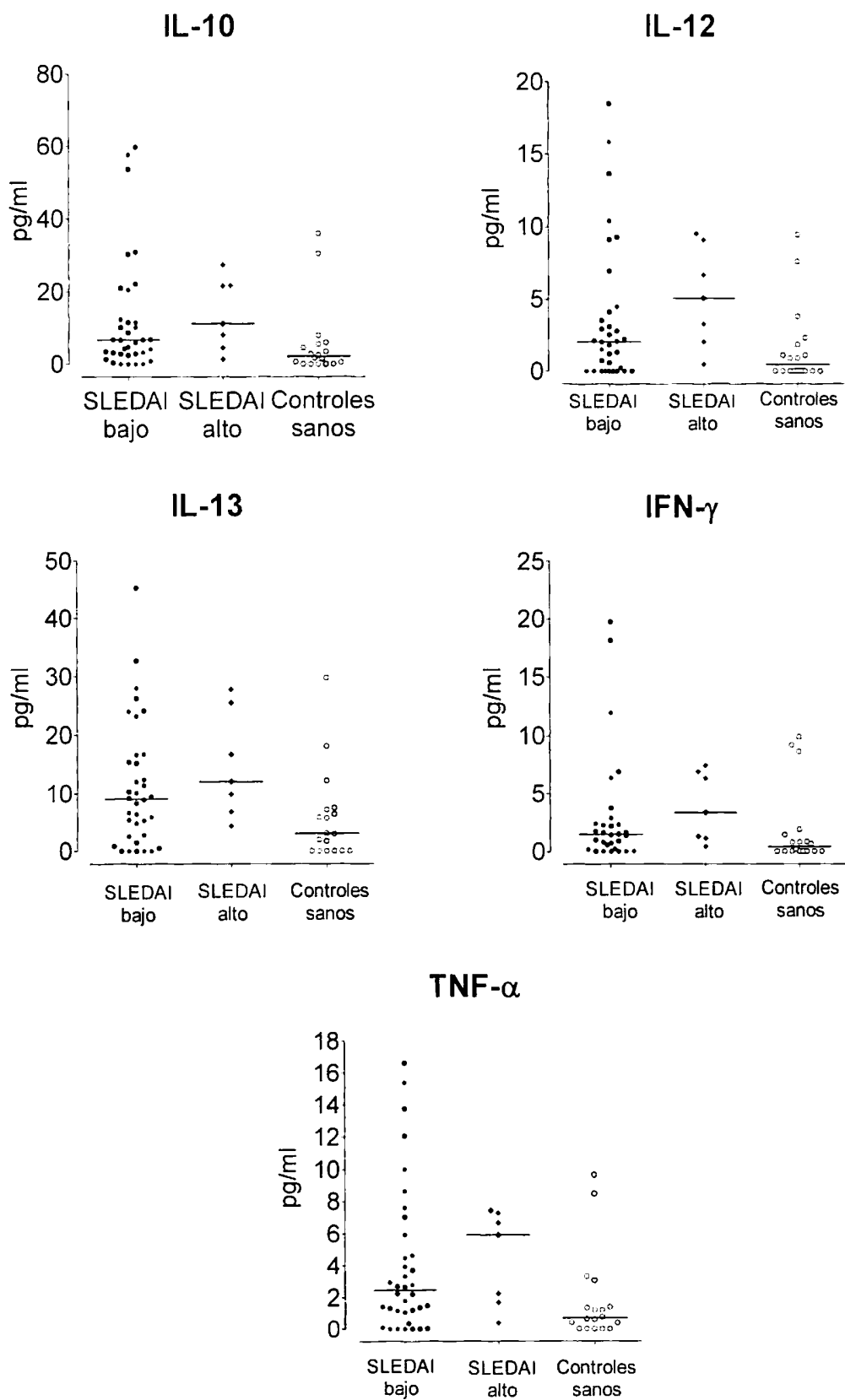
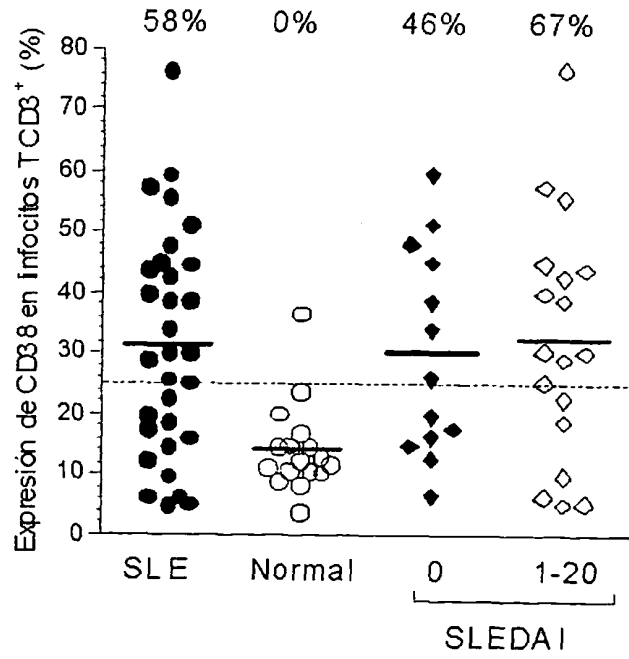


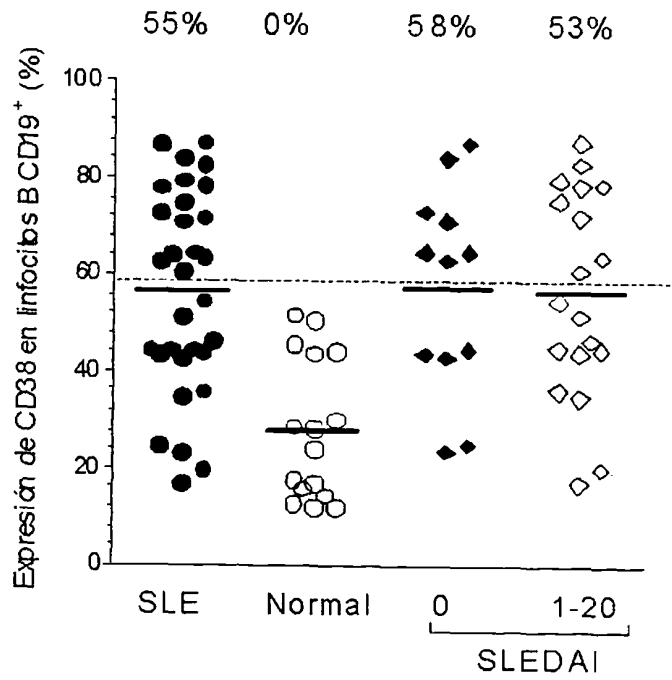
FIG. 3B

**A**



**FIG. 4A**

**B**



**FIG. 4B**

C

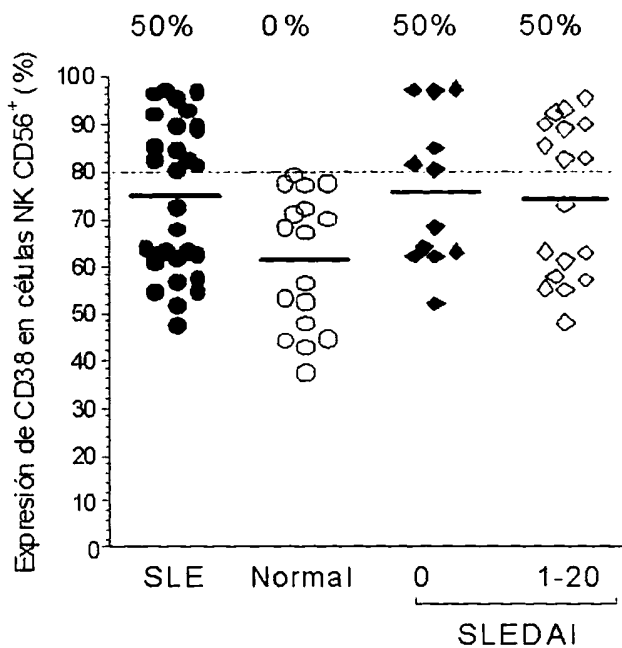


FIG. 4C

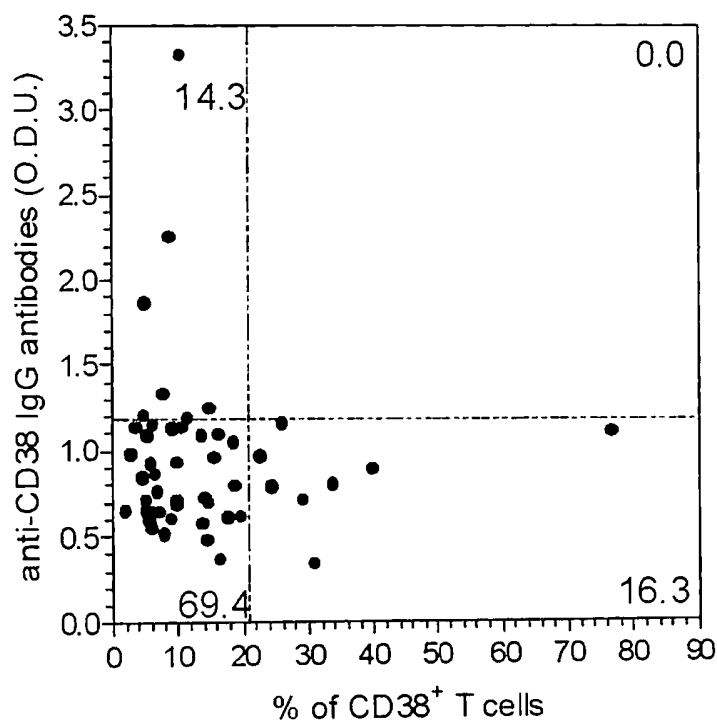


FIG. 5

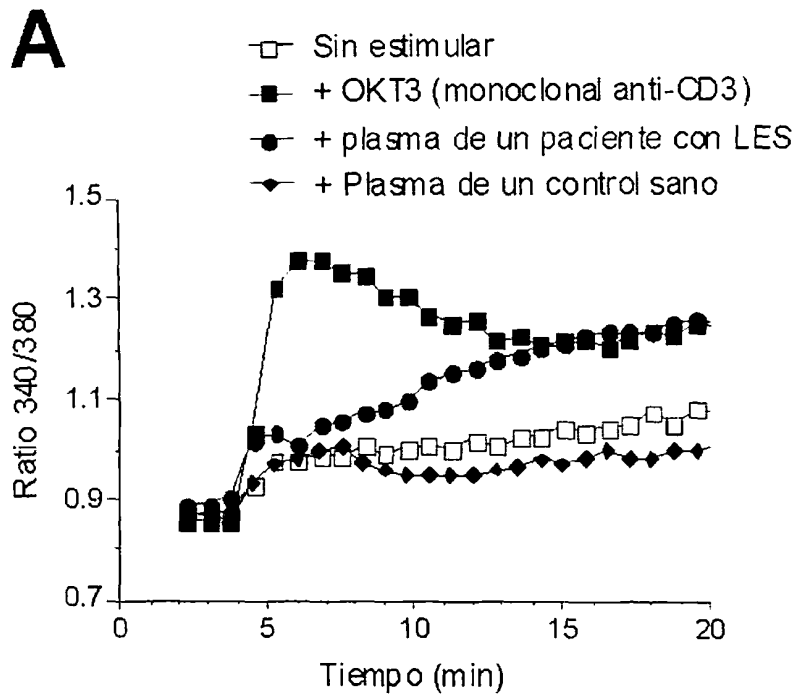


FIG. 6A

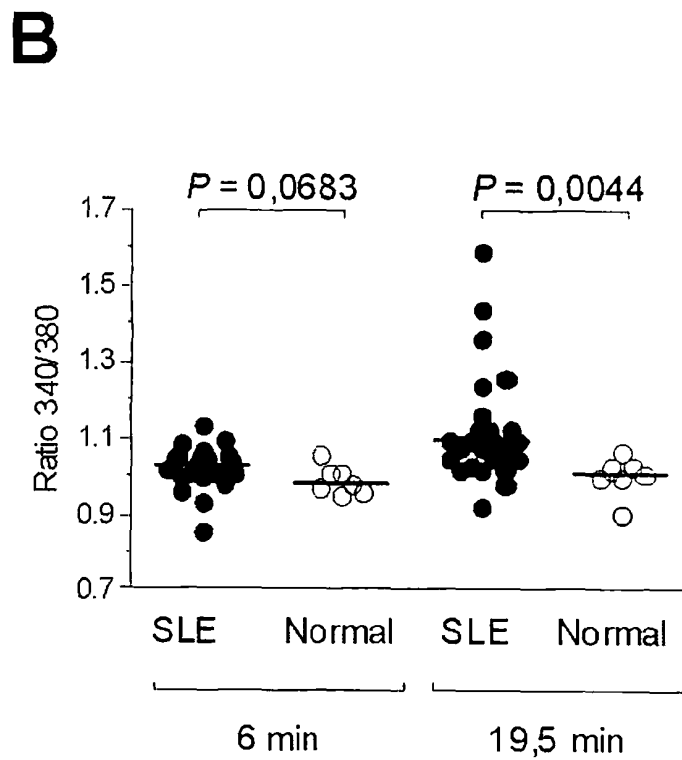


FIG. 6B

10/10

C

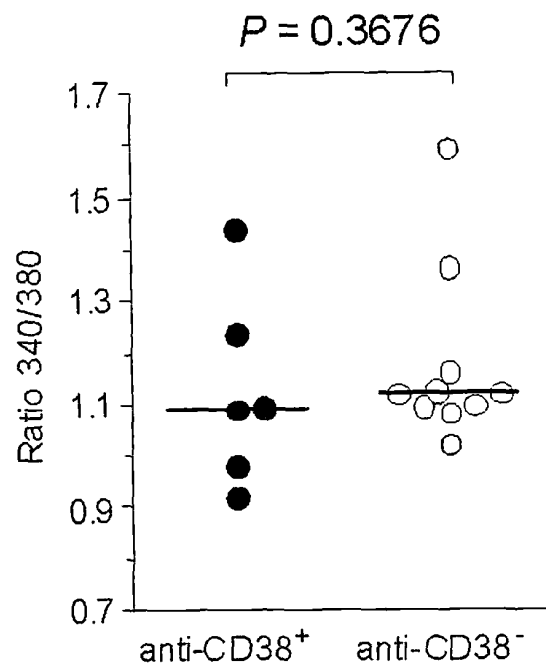


FIG. 6C



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ ES 2010/070301

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N, C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, WPI, USPTO PATENT DATABASE, INVENES, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, SCIEDIRECT

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO9942831 A1 (FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER [US/US]) 26.08.1999, page 3, line 18-line 5, page 4; claims 1-5.	1-8; 11, 12 both partly
Y	WO2009014476 A1 (ISS IMMUNE SYSTEM STIMULATION AB [SE/SE]) 29.01.2009, abstract, claims 1, 6-8.	1-8; 11, 12 both partly
Y	BIJL M et al. Fas expression on peripheral blood lymphocytes in systemic lupus erythematosus (SLE): relation to lymphocyte activation and disease activity. Lupus. 2001. Volumen 10(12), pages 866-872, abstract, pages 868-869; sección "results".	1-8; 11, 12 both partly

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>“E” earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>
---	--

Date of the actual completion of the international search

30.June.2010 (30.06.2010)

Date of mailing of the international search report

**(01/07/2010)**

Name and mailing address of the ISA/  
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.  
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

M<sup>a</sup> D. García Grávalos

Telephone No. +34 91 349 34 04

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2010/070301

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHERER Y et al. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. Seminars in Arthritis and Rheumatism. 2004. Volumen 34, pages 501-537. the whole document	1-8; 11, 12 both partly
A	KURIEN BT and SCOFIELD RH. Autoantibody determination in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. Scandinavian Journal of Immunology. 2006. Volumen 64, pages 227-235. the whole document.	1-8; 11, 12 both partly

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2010/070301

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9942831 A	26.08.1999	AU 2783599 A US 6596501 B	06.09.1999 22.07.2003
-----	-----	-----	-----
WO 2009014476 A	29.01.2009	EP 2183596 A	12.05.2010
-----	-----	-----	-----

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2010/070301

## CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

***G01N 33/543*** (2006.01)

***G01N 33/564*** (2006.01)

***C07K 16/28*** (2006.01)

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°  
PCT/ ES 2010/070301

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

G01N, C07K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, WPI, USPTO PATENT DATABASE, INVENES, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, SCIEDIRECT

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
Y	WO9942831 A1 (FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER [US/US]) 26.08.1999, página 3, línea 18- línea 5, página 4; reivindicaciones 1-5.	1-8; 11, 12 en parte
Y	WO2009014476 A1 (ISS IMMUNE SYSTEM STIMULATION AB [SE/SE]) 29.01.2009, resumen, reivindicaciones 1, 6-8.	1-8; 11, 12 en parte
Y	BIJL M et al. Fas expression on peripheral blood lymphocytes in systemic lupus erythematosus (SLE): relation to lymphocyte activation and disease activity. Lupus. 2001. Volumen 10(12), páginas 866-872, resumen, páginas 868-869; sección "results".	1-8; 11, 12 en parte

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>“&amp;” documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

30.Junio.2010 (30.06.2010)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

**01-JULIO-2010 (01/07/2010)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.  
N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

M<sup>a</sup> D. García Grávalos

N° de teléfono +34 91 349 34 04

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2010/070301

C (continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	SHERER Y et al. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. Seminars in Arthritis and Rheumatism. 2004. Volumen 34, páginas 501-537. Todo el documento	1-8; 11, 12 en parte
A	KURIEN BT y SCOFIELD RH. Autoantibody determination in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. Scandinavian Journal of Immunology. 2006. Volumen 64, páginas 227-235. Todo el documento.	1-8; 11, 12 en parte

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2010/070301

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 9942831 A	26.08.1999	AU 2783599 A US 6596501 B	06.09.1999 22.07.2003
WO 2009014476 A	29.01.2009	EP 2183596 A	12.05.2010

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2010/070301

## Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1.  Las reivindicaciones N°s. 9, 10 completas, 11 y 12 en parte se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber: puesto que se refieren a una materia que esta Administración considera que está afectada por las disposiciones de la Regla 67.1 (iv) PCT, sobre métodos de tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal. Consecuentemente, no se formulará ninguna opinión con respecto a la novedad, actividad inventiva y aplicación industrial de la materia de esas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(i) PCT).
2.  Las reivindicaciones N°s. 13 y 14 se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente: puesto que no definen claramente el objeto cuya protección se pretende. Las características técnicas que definen el kit no están indicadas claramente y no es posible por lo tanto examinar esta reivindicación con respecto a su novedad y actividad inventiva.
3.  Las reivindicaciones N°s. son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

## Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1.  Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2.  Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3.  Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s.
4.  Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s.

### Indicación en cuanto a la protesta

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.



**CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD**

***G01N 33/543*** (2006.01)

***G01N 33/564*** (2006.01)

***C07K 16/28*** (2006.01)