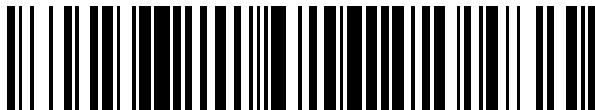


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 992 145**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2019 PCT/ES2019/070660**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2020 WO20070363**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2019 E 19869444 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2024 EP 3862436**

(54) Título: **Método para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento de la esclerosis múltiple con interferón beta**

(30) Prioridad:

02.10.2018 ES 201830953

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

09.12.2024

(73) Titular/es:

**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (50.0%)
Avda. de la Constitución 18
41071 Sevilla, ES y
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (50.0%)**

(72) Inventor/es:

**OLIVER MARTOS, BEGOÑA;
LEYVA FERNÁNDEZ, LAURA;
HURTADO GUERRERO, ISAAC;
FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, ÓSCAR y
PAVÍA MOLINA, JOSÉ**

(74) Agente/Representante:

MARTÍNEZ, Miguel Ángel

ES 2 992 145 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

Método para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento de la esclerosis múltiple con interferón beta

- 5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biomedicina, y se refiere a un método para predecir o pronosticar la respuesta de los pacientes con esclerosis múltiple al tratamiento con IFN β .

Estado de la técnica anterior

10 La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica inflamatoria y desmielinizante del sistema nervioso central (SNC), presumiblemente de origen autoinmunitario. Se caracteriza por la presencia de lesiones inflamatorias en la sustancia blanca y gris del SNC, denominadas placas, en las que se produce pérdida de mielina y cierto grado de degeneración axonal.

15 Aunque en los últimos años se han desarrollado numerosos fármacos para paliar los efectos de esta enfermedad, el interferón beta (IFN β) sigue siendo uno de los tratamientos de primera línea por su perfil de eficacia y seguridad. Numerosos ensayos clínicos han demostrado que IFN β disminuye la frecuencia y gravedad de los brotes, el número y volumen de las lesiones cerebrales observadas por resonancia, y la progresión en la escala expandida del estado de discapacidad. Sin embargo, un porcentaje importante de pacientes (30-50 %) no responden adecuadamente al tratamiento, ya que continúan experimentando brotes y progresan en la escala expandida del estado de discapacidad.

25 El documento WO2015140793 divulga un método para predecir la sensibilidad de un sujeto con esclerosis múltiple al tratamiento con interferón (IFN), en particular IFN β , que comprende determinar el nivel de expresión de una pluralidad de genes que comprenden cinasa Janus 1 (JAK1), receptor de interferón (alfa, beta y omega) 2 (IFNAR2), SKI, o su combinación, en el que una diferencia significativa entre el nivel de expresión de los genes en la muestra del sujeto, en comparación con un valor de control, es indicativa de la sensibilidad del sujeto al tratamiento con IFN.

30 Aunque existen numerosos biomarcadores de respuesta al tratamiento en fase de investigación, no existe ninguno validado e implantado en la práctica clínica que ayude a predecir si un paciente con esclerosis múltiple (EM) va a responder adecuadamente al tratamiento con IFN β .

35 Es necesario, por tanto, disponer de una prueba, de manera preferible mínimamente invasiva y fácil de realizar, para determinar si un paciente con esclerosis múltiple va a responder o no al tratamiento con IFN β .

Descripción de las figuras

Figura 1. Detección de sIFNAR2 recombinante por inmunotransferencia de tipo Western (A) y curva estándar de ELISA (B) en valores medios de densidad óptica (DO) frente a concentración (conc.).

40 Figura 2. Determinación mediante ELISA de la concentración de sIFNAR2 en suero de pacientes con EM no tratados (UT-MS) y controles sanos (HC). Los pacientes con EM no tratados mostraron niveles de sIFNAR2 significativamente menores que HC (Orpez-Zafra et al, 2015)

45 Figura 3. Los pacientes UT-MS mostraron niveles de sIFNAR2 significativamente más bajos que los controles sanos (HC) y los controles de otras enfermedades neurológicas inflamatorias (OIND), y no mostraron diferencias con los pacientes con síndrome clínicamente aislado (CIS). El grupo heterogéneo de OIND no mostró diferencias significativas con los HC y sus niveles aumentaron significativamente cuando se compararon con pacientes tratados con IFN β (MS-IFN β). Por otro lado, los pacientes con EM tratados con IFN β mostraron niveles de sIFNAR2 significativamente más altos que los pacientes con EM sin tratamiento previo y fueron significativamente más bajos que los de HC.

55 Figura 4. Seguimiento del tratamiento con IFN β a lo largo del tiempo, al inicio (T0), a los 6 meses (6T), y hasta los 12 meses (T12). El tratamiento con IFN β aumenta los niveles de sIFNAR2. Con todos los pacientes analizados, el IFN β aumentó significativamente los niveles de sIFNAR2 después de 6 meses desde el inicio del tratamiento.

60 Figura 5. Niveles de sIFNAR2 basales como biomarcador de respuesta al IFN β . Antes del inicio del tratamiento (T0), los pacientes clasificados como no respondedores (NR) tenían niveles significativamente más bajos de sIFNAR2 en comparación con los pacientes clasificados como respondedores (R). El análisis de regresión logística mostró que los pacientes con niveles de sIFNAR2 basales menores de 43,2 ug/ml tenían una OR de 5,1 pacientes que no respondieron al tratamiento con IFN β . El modelo se ajustó para posible.

65 Figura 6. Respuesta al tratamiento con IFN β en NR, al inicio del tratamiento (T0), a los 6 meses (6T), y hasta 12 meses (T12). Los niveles de sIFNAR2 en estos pacientes aumentaron significativamente después de 6 meses de tratamiento.

Figura 7. Respuesta al tratamiento con IFN β en R, al inicio del tratamiento (T0), a los 6 meses (6T), y hasta 12 meses (T12). Los niveles de sIFNAR2 en estos pacientes permanecieron estables después de 6 meses de tratamiento.

5 Figura 8. Relación con otras variables clínicas. Se observaron altos niveles de sIFNAR2 en pacientes durante la recaída (Rel) en comparación con el mismo paciente en remisión (Rem) ($p = 0,002$).

10 Figura 9. Análisis de la forma clínica evolutiva de esclerosis múltiple desde RR: recaídas-remisiones; SP: progresiva secundaria; hasta PP: progresiva primaria. Se observó que sIFNAR2 estaba elevado en PP en comparación con RR y SP ($p = 0,042$, $p = 0,010$).

Descripción de la invención

15 Los autores de la presente invención han evaluado los niveles de sIFNAR2 en suero como biomarcador de la respuesta a IFN β , así como su relación con otras variables clínicas, desarrollando un método para predecir o pronosticar la respuesta a IFN β en pacientes con esclerosis múltiple. Tal y como se muestra en los ejemplos de la presente invención, los niveles basales de sIFNAR2 pueden predecir de respuesta al tratamiento con IFN β y pueden tener aplicabilidad clínica al momento de seleccionar el tratamiento. Los niveles basales inferiores de sIFNAR2 en pacientes no respondedores se restablecen después de seis meses de tratamiento con IFN β y alcanzan valores similares a los pacientes respondedores.

20 En resumen, los autores de la presente invención proponen la determinación de un biomarcador en suero con una técnica desarrollada en su laboratorio que permite predecir si un paciente con EM va a responder o no al tratamiento con IFN β .

25 Entre otras ventajas, la prueba es mínimamente invasiva para el paciente puesto que se realiza en suero, y además es fácil de implementar ya que el ELISA es una herramienta común utilizada en laboratorios clínicos.

30 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

35 Un primer aspecto divulgado se refiere al uso de los niveles de producto de expresión de *IFNAR2.3* y/o de sIFNAR2, preferiblemente de los niveles en suero, para predecir o pronosticar la respuesta de un individuo con esclerosis múltiple al tratamiento con IFN β .

40 Se han identificado múltiples variantes de la transcripción que codifican por lo menos tres isoformas diferentes para el gen que codifica la subunidad IFNAR2 del receptor de IFN β . La secuencia de aminoácidos de sIFNAR2 se encuentra en el GenBank (NCBI) con el número de registro L41943.1 y en la SEQ ID NO: 2 en referencia al gen *IFNAR2.3*. Dicha SEQ ID NO: 2 está representada por la siguiente secuencia de aminoácidos:

(MLLSQNAFIFRSNLVLMVYISLVFGISYDSPDYTDESCTFKISLRNFRSILSWELKNHSIVPTHY
TLLYTMSKPEDLKVVKNCANTTRSFCDLTDEWRSTHEAYVTVLEGFSGNNTLFSCSHNFWLAI
DMSFEPPEFEIVGFTNHINVMVKFPSIVEEELQFDLSSLVIEEQSEGIVKKHKPEIKGNMSGNFTYII
DKLIPNTNYCVSVYLEHSDEQAVIKSPLKCTLPPGQESEFS).

45 En el contexto de la presente divulgación, sIFNAR2 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 2, y que comprendrá diversas variantes procedentes de:

50 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2,

55 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia de polinucleótido de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, un 98 % o un 99 % con la SEQ ID NO: 2, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína IFNAR2.3. Dichas moléculas de ácido nucleico incluyen, entre otras, la molécula recogida en la secuencia de GenBank (NCBI) L41943.1 y la SEQ ID NO: 1. Dicha SEQ ID NO: 1 está representada por la siguiente secuencia de nucleótidos:

(agatgtaaaaagtcaagagaagactctaaaatagcaaagatgcttgagccagaatgcctcatcttcagatcacttaattggttcctc
atggtgtatatcagccctcggttggatttcataatgattcgccctgattacacagatgaatctgcacttcaagatcatggcggaaatttccg
gtccatcttatcatgggaattaaaaaccactccattgtaccaactactatacattgtgtatacatgagtaaccagaagatttg
aagggtggttaagaactgtgcaaataccacaagatcatttgacctcacagatgagtggagaagcacacacgaggctatgtcacc
gtccctagaaggattcagcgggaaacacaacgttgcgtcacacaattctggctggccatagacatgtcttgaaccaccagag
ttttagattgtggtttaccaaccacattaatgtatggtaaaattccatctattgtgaggaagaattacagttgattatctctgtcattg
aagaacagttagaggaaattgttaagaagcataaaccgaaataaaaggaaacatgagtggaaattcacctatcatgacaag
ttaattccaaacacgaactactgtatctgttttttagagcacagtgtatgcagaagcagaataaaagtctccctaaaatgcaccctct
tccaccctggccaggaatcagaatttcataacttttagccctggccattcctaacctgccaccgttgaagccatggatatgggaggt
catttacatcaacagaaagaagaaggaaagtgtggattataattatgtatgtatgaaagtgtatagcgataactgaggcagcgcccaggacaa
gtggcgggtgctataccatgtatggactgtcaggcctctgggtcaggcctctggccacctctacagaatcccagttgatagaccccg
gagtccgaggaggagcctgacctgcctgagggtatgtggagctccccacgatgccaaggacagccctcagcagttgaaactctt
gagtggccctgtgagaggagaaagagtccactccaggaccctttccgaagaggactacagctccacggagggctgggg
agaattacctcaatgtggacttaaactctgtgttttagaggtctgtatgacgaggacagtgcacacttagaagccctctgtatgcata
gtctcatctggaaagagatggtgacccagaggatcctgataatgtcaatcaaaccattgtggccagcggggaaaggacacac
caacctttccagcccttcagagggcctgtggccgaagatgtccatctgtatcaaagtgcacacttctgagtcagatgtgaccttg
ggatggttatataatgagatgactccaaaactattgaatgaacttggacagacaagcacctacagggtcttgcacatt
gctgccttatctgtcaagtgttccaaaggagggagggagaaactgtgggttcccttcaggtgacatcacatgcacattcc
cagtagggaccatagtatcattcagtgcatgtttacatattcaaagtggtcacttgaaggaagcacatgtgcaccccttacact
aatgcacttaggatgttctgcatcatgttaccaggagcagggtccccacagttcagagggtggccaggaccctatgatattctt
cttcgttcttttttttttttttagacagagatctcggtctgtcccaagctggagcgcaatgggtgatctggctactgcaacatccgct
cccggttcagggtattctccctgcctcagccctcgcaagtagctggattacaggcgcctggccaccatgccttagcaaattttgtatt
ttatgtggagacaggatttaccatgtggccaggctggctcgaaactcctgacctcaagtgtatctccctctcagcctcgtaaagtctg
ggattacagggtgagccgtgtccctggctggccctgtgatattctgtgaaataaattggccagggtggagcaggaaagaaaa
aggaaaatagtagcaagagactgcaaaacgaggcaggagggaggagagccagggtgagcagtgagtagaaggggggcc
tgcacaaggaaacagggaaagagccatcgaagttcagtcggtgagccctggcacccatgtcacatcctgtccctgcaattg
gaattccacccatgtccagccctcccaagttaaagtgggaaagacagacttaggatcacgtgtgactaatacagaaaggaaacat
ggcgtcggggagaggagaaaacctgatgcctatlttaagttaaaaaaaaaaaa).

Un segundo aspecto divulgado se refiere a un método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la respuesta de un individuo con esclerosis múltiple al tratamiento con IFN β , de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

- a) medir los niveles de producto de expresión de *IFNAR2.3* y/o de *sIFNAR2* en una muestra biológica aislada del individuo, y
 - b) comparar los niveles obtenidos en la etapa (a) con una cantidad de referencia.

Un primer aspecto de la invención se refiere a un método para predecir o pronosticar la respuesta de un individuo con esclerosis múltiple al tratamiento con IFN β que comprende:

- a) medir los niveles de proteína sIFNAR2 en una muestra de suero aislada del individuo, y
 - b) comparar los niveles obtenidos en la etapa (a) con una cantidad de referencia, y
 - c) asignar al individuo de la etapa (a) al grupo de individuos no respondedores cuando presenta unos niveles de

proteína sIFNAR2 en suero significativamente más bajos en comparación con los individuos respondedores.

La cantidad de referencia se obtiene a partir de los valores de expresión constitutiva de *IFNAR2.3*, en un grupo de individuos que responden al tratamiento de la esclerosis múltiple con IFN β . Las cantidades de referencia adecuadas pueden determinarse mediante el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia que puede analizarse, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica de prueba. En este sentido, por ejemplo, pero sin limitación, la muestra de referencia puede ser los controles negativos, es decir, las cantidades detectadas mediante el método de la invención en muestras de individuos que no responden al tratamiento de la esclerosis múltiple con IFN β . En la invención, el producto de expresión de *IFNAR2.3* es la proteína sIFNAR2. En otra realización más preferida, la invención comprende comparar la detección de la proteína sIFNAR2 en la muestra biológica de (a) con la detección de la proteína sIFNAR2 en una población de referencia.

Los métodos de la invención para identificar los individuos con esclerosis múltiple que responden y que no responden al tratamiento con IFN β se llevan a cabo, preferiblemente, antes de iniciar el tratamiento con IFN β .

El término "comparación", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere, pero no se limita, a la comparación de los niveles de productos de expresión de *IFNAR2.3* y/o de sIFNAR2 en una muestra de prueba con la población de referencia, o alternativamente, a la comparación de la cantidad de los productos de expresión génica o la cantidad de anticuerpos anti-*IFNAR2.3* y/o sIFNAR2 de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica de prueba, con una cantidad de los productos de expresión génica o con una cantidad de anticuerpos anti-*IFNAR2.3* y/o de los niveles de sIFNAR2 de una o más muestras de referencia deseables. La muestra de referencia puede analizarse, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica de prueba. La comparación descrita en la parte (c) del método de la presente invención puede realizarse manualmente o con la ayuda de un ordenador.

Las etapas (b) y/o (c) de los métodos descritos anteriormente pueden estar total o parcialmente automatizadas, por ejemplo, por medio de un equipo robótico de detección para la detección de la cantidad en la etapa (b) o la realización de una comparación computerizada en la etapa (c).

El método es un método *in vitro*, y la muestra en la que se miden los parámetros es una muestra aislada. En este sentido, una "muestra biológica aislada" incluye, pero no se limita a, células, tejidos, y/o líquidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica. En la invención, la muestra biológica aislada de un individuo en la etapa (a) es suero. En otro aspecto (no reivindicado), la muestra biológica aislada de un individuo en la etapa (a) es líquido cefalorraquídeo.

El término "individuo", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. El término "individuo" no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser el individuo de cualquier edad y sexo, y pudiendo estar en cualquier condición física.

Los niveles de "sIFNAR2", tal y como se entiende en la presente memoria, hacen referencia al producto de expresión del gen *IFNAR2.3*, siendo preferiblemente la secuencia de aminoácidos de sIFNAR2.

La medida de los niveles de sIFNAR2, aunque puede ser cualitativa, también puede determinarse la cantidad o la concentración de manera cuantitativa o semicuantitativa, y puede llevarse a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración del producto de expresión génica, basándose en una señal que se obtiene directamente de la detección de la proteína. Dicha señal, que también puede denominarse señal de intensidad, puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de dichos productos. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario o un sistema de medida biológico (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, "etiquetas" o productos de reacción enzimática).

La detección de los niveles de producto de expresión de *IFNAR2.3* y/o de sIFNAR2 puede realizarse por cualquier medio conocido en el estado de la técnica.

En otra realización preferida, la detección de la cantidad de niveles de sIFNAR2 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 una reacción de conjugación de anticuerpo-antígeno. Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitación: inmunotransferencia, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, x-map o chips de proteína.

En otra 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 puede inmovilizarse un inmunorreactivo (antígeno o anticuerpo) sobre un soporte sólido, poniendo entonces dicho 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 de tipo sándwich. En una realización preferida de este aspecto de la

invención, el ELISA es un ELISA de tipo sándwich.

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 de anticuerpos anti-IFNAR2.3. El compuesto marcador se selecciona de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula que puede conjugarse con otra molécula o detectarse y/o cuantificarse 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 limitación, enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, isótopos radiactivos como ^{32}P o ^{35}S , fluorocromos como fluoresceína o partículas metálicas, para su detección directa mediante colorimetría, auto-radiografía, fluorimetría, o metalografía, respectivamente.

KIT O DISPOSITIVO DE DIAGNÓSTICO Y USOS

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un kit que comprende los elementos necesarios para cuantificar los niveles de proteína sIFNAR2 en suero, para predecir o pronosticar la respuesta de un individuo con esclerosis múltiple al tratamiento con IFN β ; en el que dicho kit comprende al menos un anticuerpo anti-sIFNAR2.

En una realización preferida, el kit comprende anticuerpos secundarios o controles positivos y/o negativos. En una realización mucho más preferida, el kit comprende el polipéptido usado en la invención, producido por tecnología recombinante, como control positivo. El kit puede incluir además, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, 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 instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.

En otra realización preferida, el kit comprende:

- a) un soporte sólido con un anticuerpo primario unido al mismo
- b) anticuerpo secundario
- c) una solución que contiene un anticuerpo de detección marcado con un marcador enzimático;
- d) un reactivo.

En una realización aún más preferida, el anticuerpo primario es un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3

(MLLSQNAFIVRSNLVLMVYISLVFGISYDSPDYTDESCTFKISLRNFRSILSWELKNHSIVPTHY
TLLYTIMSKPEDLKVVKNCANTTRSFCDLTDEWRSTHEAYVTVLEGFSGNNTLFSCSHNFWLAI
DMSFEPPEFEIVGFTNHINVMVKFPSIVEEEELQFDLSLVIEEQSEGIVKKHKPEIKGNMSGNFTYII
DKLIPNTNYCVSVYLEHSDEQAVIKSPLKCTLLPPGQESESAESAESAKIGGIITVFLIALVLTSTIVTLK
WIGYICLRNSLPKVLRQGLTKGWNAVIAHRC SHNALQSETPELKQSSCLSF PSSWDYKRASLCP
SD).

En otra realización más preferida, el anticuerpo secundario es un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4

(MLLSQNAFIVRSNLVLMVYISLVFGISYDSPDYTDESCTFKISLRNFRSILSWELKNHSIVPTHY
TLLYTIMSKPEDLKVVKNCANTTRSFCDLTDEWRSTHEAYVTVLEGFSGNNTLFSCSHNFWLAI
DMSFEPPEFEIVGFTNHINVMVKFPSIVEEEELQFDLSLVIEEQSEGIVKKHKPEIKGNMSGNFTYII
DKLIPNTNYCVSVYLEHSDEQAVIKSPLKCTLLPPGQESESAESAESAKIGGIITVFLIALVLTSTIVTLK
WIGYICLRNSLPKVLRQGLTKGWNAVIAHRC SHNALQSETPELKQSSCLSF PSSWDYKRASLCP
SD)

USOS MÉDICOS

Por tanto, los individuos con esclerosis múltiple identificados como respondedores al IFN β según los métodos de la invención pueden tratarse con IFN β .

- 5 Por tanto, otro aspecto descrito se refiere a un método de clasificación de individuos con esclerosis múltiple en dos grupos, un primer grupo que incluye individuos identificados como respondedores al IFN β y un segundo grupo que incluye individuos identificados como no respondedores al IFN β .
- 10 Otro aspecto descrito se refiere a IFN β para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple en un individuo clasificado como respondedor según cualquiera de los métodos de la invención.

AUTOMATIZACIÓN DEL MÉTODO DE LA INVENCIÓN IMPLEMENTÁNDOLO EN UN PROGRAMA DE ORDENADOR

- 15 Otro aspecto descrito se refiere a un programa de ordenador que comprende instrucciones de programa para hacer que un ordenador lleve a cabo el procedimiento de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención.
- 20 En particular, la divulgación abarca programas de ordenador dispuestos sobre o dentro de un soporte. El soporte puede ser cualquier entidad o dispositivo capaz de soportar el programa. Cuando el programa va incorporado en una señal que puede transportarse directamente por un cable u otro dispositivo o medio, el soporte puede estar formado por dicho cable u otro dispositivo o medio. Como variante, el soporte puede ser un circuito integrado en el que va incluido el programa, estando el circuito integrado adaptado para ejecutar, o para utilizarse en la ejecución de, los procedimientos correspondientes.
- 25 Por ejemplo, los programas pueden estar incorporados en un medio de almacenamiento, como una memoria ROM, una memoria CD ROM, o una memoria ROM de semiconductor, una memoria USB, o un soporte de grabación magnética, por ejemplo, un disco flexible o un disco duro. Alternativamente, los programas pueden estar soportados en una señal portadora transmisible. Por ejemplo, puede tratarse de una señal eléctrica u óptica que puede transportarse a través de cable eléctrico u óptico, por radio o por cualquier otro medio.
- 30 La divulgación también cubre programas de ordenador adaptados para que cualquier medio de procesamiento pueda llevar a la práctica los métodos de la invención. Tales programas pueden estar en forma de código fuente, código objeto, una fuente intermedia de código y código objeto, por ejemplo, como en forma parcialmente compilada, o en cualquier otra forma adecuada para uso en la puesta en práctica de los procedimientos según la invención. Los programas de ordenador también abarcan aplicaciones en la nube basadas en dicho método.

- 35 Otro aspecto descrito se refiere a un medio de almacenamiento legible por ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo las etapas de cualquiera de los métodos de la invención.

- 40 Otro aspecto descrito se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo las etapas de cualquiera de los métodos de la invención.

- 45 El primer y/o el segundo métodos de la invención pueden incluir etapas adicionales, como por ejemplo, la separación de proteínas mediante electroforesis mono y bidimensional (2D-PAGE), o la digestión previa con tripsina de una mezcla de proteínas (de la muestra) para después purificar y analizar los péptidos mediante espectrometría de masas (MS), como el MALDI-TOF, o mediante cromatografía multidimensional, mediante ICAT ("isotope-coded affinity tags", etiquetas de afinidad codificadas por isótopos), DIGE ("differential gel electrophoresis", electroforesis en gel diferencial), o matrices de proteínas.

- 50 Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN) como desoxirribonucleótidos (ADN).

- 55 Los términos "secuencia de aminoácidos", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser aminoácidos codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

- 60 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, el término "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Para los expertos en la técnica, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

- 65 **Ejemplos de la invención**

En primer lugar, los autores de la invención clonaron una proteína recombinante análoga a sIFNAR2 humano, que se identificó mediante WB y también mediante MALDI-TOF. Esta proteína se usó en el desarrollo y la validación de un ELISA para detectar sIFNAR2 en suero (figura 1) (Órpez-Zafra T. Bioanalysis 2015; 2869-2880). La implementación clínica en dos cohortes independientes mostró niveles significativamente más bajos en pacientes con EM no infartados que en controles sanos (figuras 2 y 3) y niveles aumentados en pacientes tratados con IFN β (figura 3) (Órpez-Zafra T. Bioanalysis 2015; 2869-2880; Órpez-Zafra T. Mult Scler., junio de 2017; 23(7):937-945). Se trata de una proteína recombinante de sIFNAR2, de 249 aminoácidos y un peso molecular de 29 KDa, que corresponde a la fracción soluble del receptor de IFN β . Esta proteína se ha usado como patrón en el desarrollo y la validación de un ELISA para la detección de la forma soluble del receptor de IFN β (sIFNAR2) en suero.

5

Se realizó un estudio longitudinal que incluyó 66 pacientes con EM (basales, 6 y 12 meses después del inicio del tratamiento con IFN), 51 clasificados como respondedores (R) y no respondedores (NR) de acuerdo con la puntuación de Rio (Rio J. Mult Scler. 2009. 15: 848-53). Los brotes, la progresión en la escala expandida del estado de discapacidad (EDSS), y la actividad de MRI se consideraron como las variables de respuesta a la terapia.

10

Veintitrés pacientes se consideraron no respondedores de acuerdo con la aparición de dos o tres variables positivas durante el primer año de terapia, en contraposición 28 se consideraron respondedores. Además, se incluyeron 12 pacientes con EM en el momento de brote y posteriormente en remisión. Para la forma clínica, se analizaron 143 pacientes con recaídas-remisiones, 43 progresivos secundarios y 12 progresivos primarios.

15

20

La cuantificación de sIFNAR2 en suero se realizó mediante un ELISA desarrollado y validado en el laboratorio de los presentes autores (Órpez-Zafra T. Bioanalysis 2015; 2869-2880). Cada ensayo incluyó una curva estándar, 2 controles de calidad, y un control negativo. La concentración de sIFNAR2 se determinó mediante la interpolación óptica de las muestras y los controles en la curva estándar. La curva de calibración se estableció utilizando un modelo de ajuste de curvas de cuatro parámetros. Se usaron pruebas no paramétricas para comparar los niveles de sIFNAR2 entre grupos.

25

Se observó que antes del inicio del tratamiento, los pacientes NR tenían niveles significativamente más bajos de sIFNAR2 en comparación con los pacientes R ($p = 0,026$). El análisis de regresión logística mostró que los pacientes con niveles basales de sIFNAR2 inferiores a 43,2 μ g/ml tienen una OR de 5,1 ($p = 0,012$, IC [1,42-18,25]) de no respondedores al tratamiento con IFN β . El modelo se ajustó para posibles variables de confusión, como sexo, edad, y tiempo de evolución. Por tanto, individuos que presenten niveles basales de sIFNAR2 inferiores a 100 μ g/ml, y más preferiblemente inferiores a 90, 80, 70, 60, 50, y aún más preferiblemente 45 μ g/ml, pueden incluirse en el grupo de individuos con esclerosis múltiple que no responden al tratamiento con IFN β .

30

35 La tabla 1 muestra el análisis de regresión logística del riesgo de no respondedor según los niveles de sIFNAR2.

Modelo de regresión logística	Niveles de sIFNAR2 (ng/ml)	OR	IC del 95 %	P valor
Riesgo de no respondedor	$\leq 43,2$ frente a $> 43,2$	5,1	1,42-18,25	0,012
Edad		1,048	0,977-1,123	0,190
Sexo		1,930	0,512-7,24	0,331

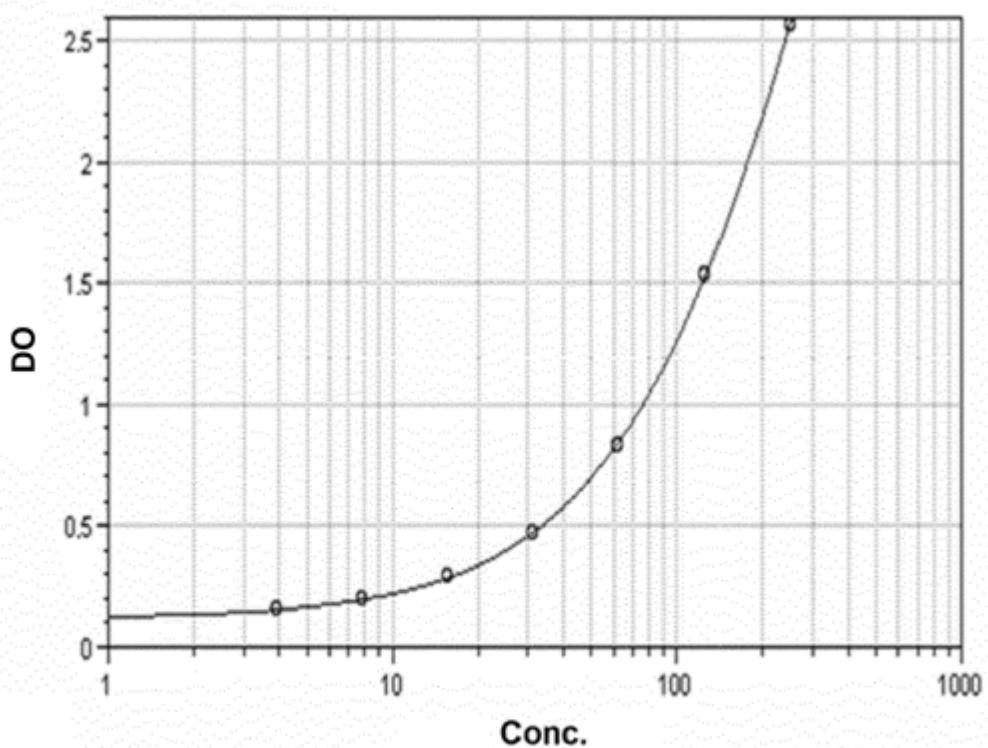
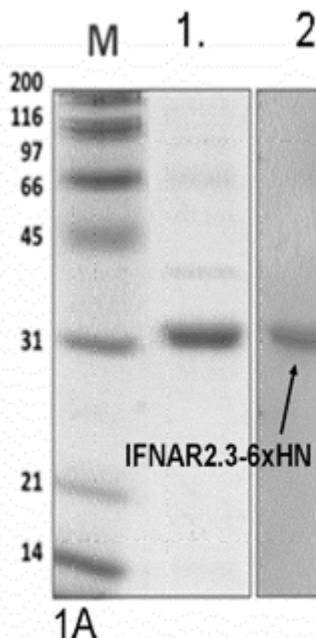
40

La determinación de sIFNAR2 mediante ELISA puede utilizarse en la práctica clínica como biomarcador para predecir si un paciente va a responder al tratamiento con IFN β . La técnica de ELISA es de fácil implantación en los laboratorios de diagnóstico clínico y, al realizarse la determinación en suero, supone un método mínimamente invasivo para el paciente.

REIVINDICACIONES

1. Método para predecir o pronosticar la respuesta de un individuo con esclerosis múltiple al tratamiento con IFN β que comprende:
 - 5 a) medir los niveles de proteína sIFNAR2 en una muestra de suero aislada del individuo, y
 - b) comparar los niveles obtenidos en la etapa (a) con una cantidad de referencia, y
 - 10 c) asignar al individuo de la etapa (a) al grupo de individuos no respondedores cuando presenta unos niveles de proteína sIFNAR2 en suero significativamente más bajos en comparación con los individuos respondedores.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que la determinación de los niveles de sIFNAR2 se realiza mediante un inmunoensayo.
- 20 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la determinación de los niveles de sIFNAR2 se realiza mediante una técnica que se selecciona de: inmunotransferencia, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, o chips de proteína.
- 25 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la determinación de los niveles de sIFNAR2 se realiza mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA.
- 30 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la determinación de los niveles de sIFNAR2 se realiza mediante un ELISA de tipo sándwich.
- 35 6. Uso de un kit que comprende los elementos necesarios para cuantificar los niveles de proteína sIFNAR2 en suero, para predecir o pronosticar la respuesta de un individuo con esclerosis múltiple al tratamiento con IFN β ;
- 40 7. Uso de un kit según la reivindicación anterior, que comprende un anticuerpo primario que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
- 45 8. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, que comprende un anticuerpo secundario que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.
- 50 9. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende una proteína recombinante que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
10. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, que comprende además:
 - a) un soporte sólido con un anticuerpo primario unido al mismo;
 - b) un anticuerpo secundario;
 - c) una solución que contiene un anticuerpo de detección marcado con un marcador enzimático; y
 - d) un reactivo.

Fig. 1



$$y = ((A - D)(1 + (x/C)^B)) + D;$$

A	0,118
B	1,12
C	415,276
D	6,91
R²	1

1B

Fig. 2

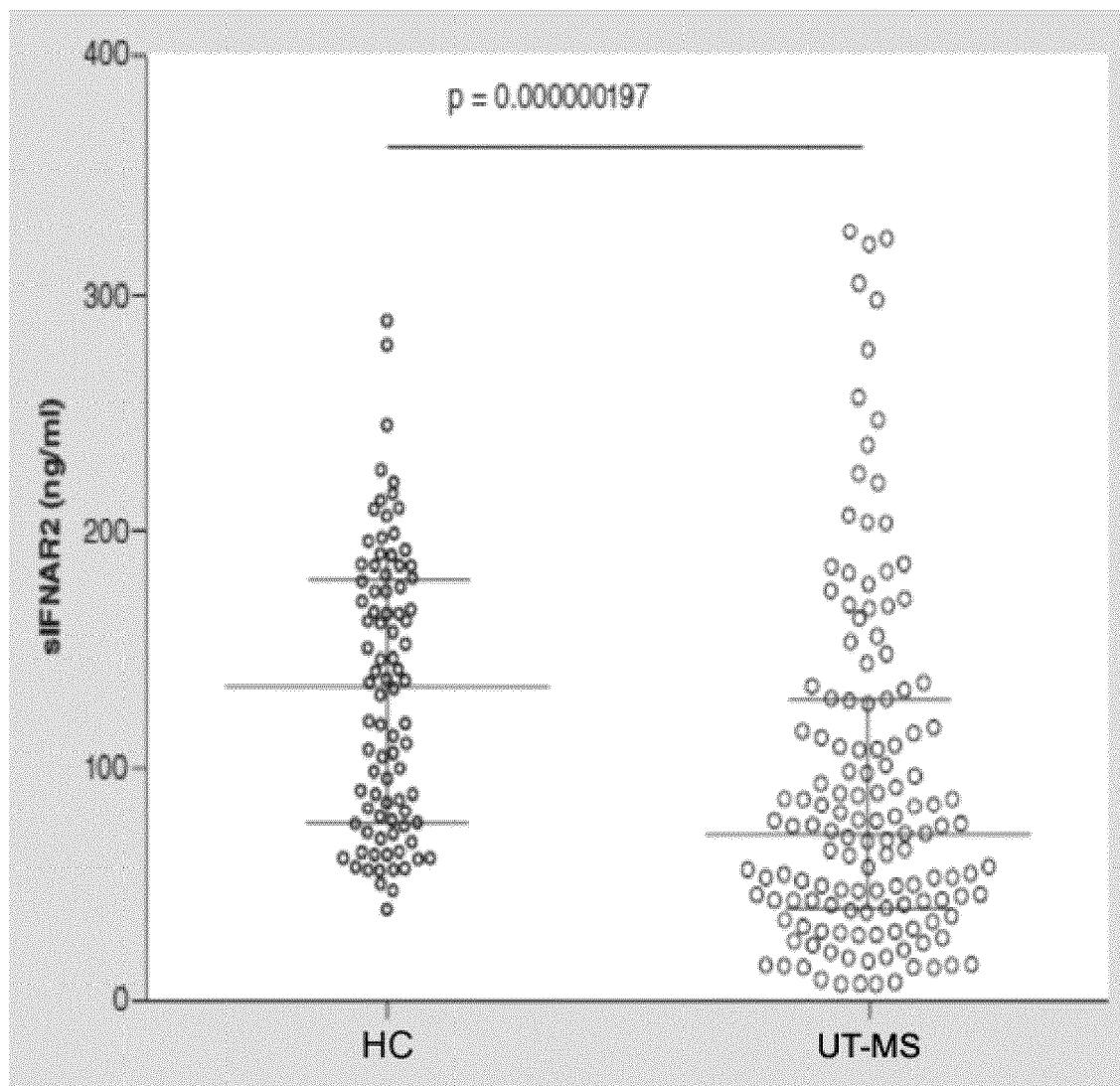


Fig. 3

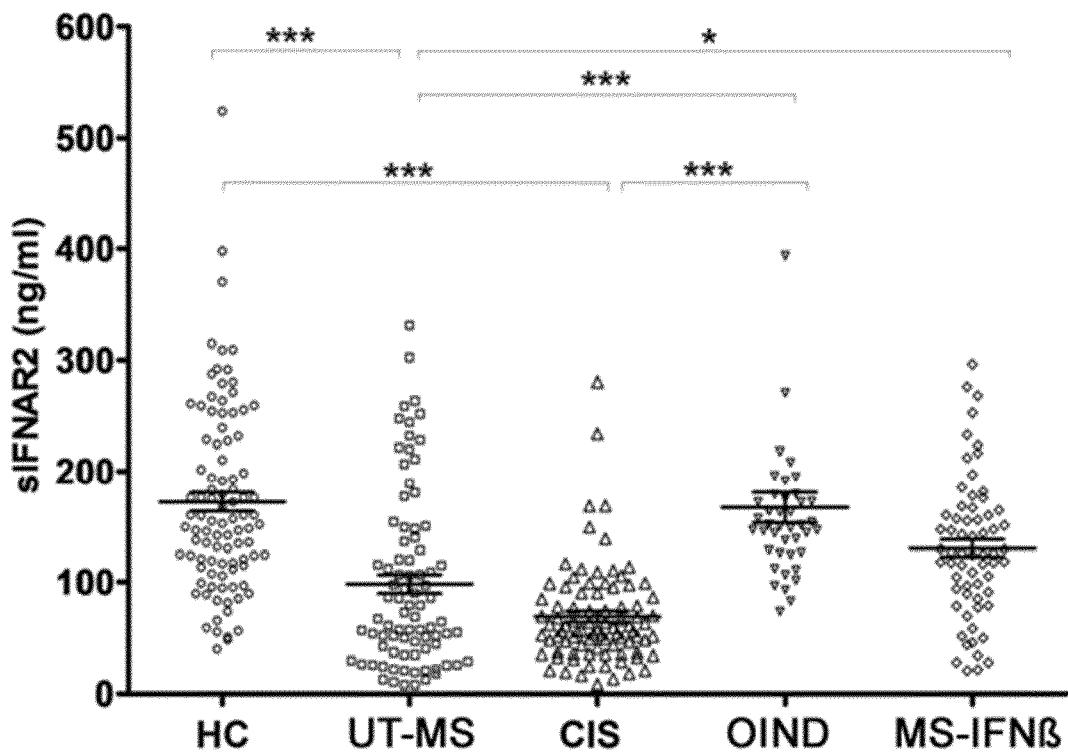


Fig. 4

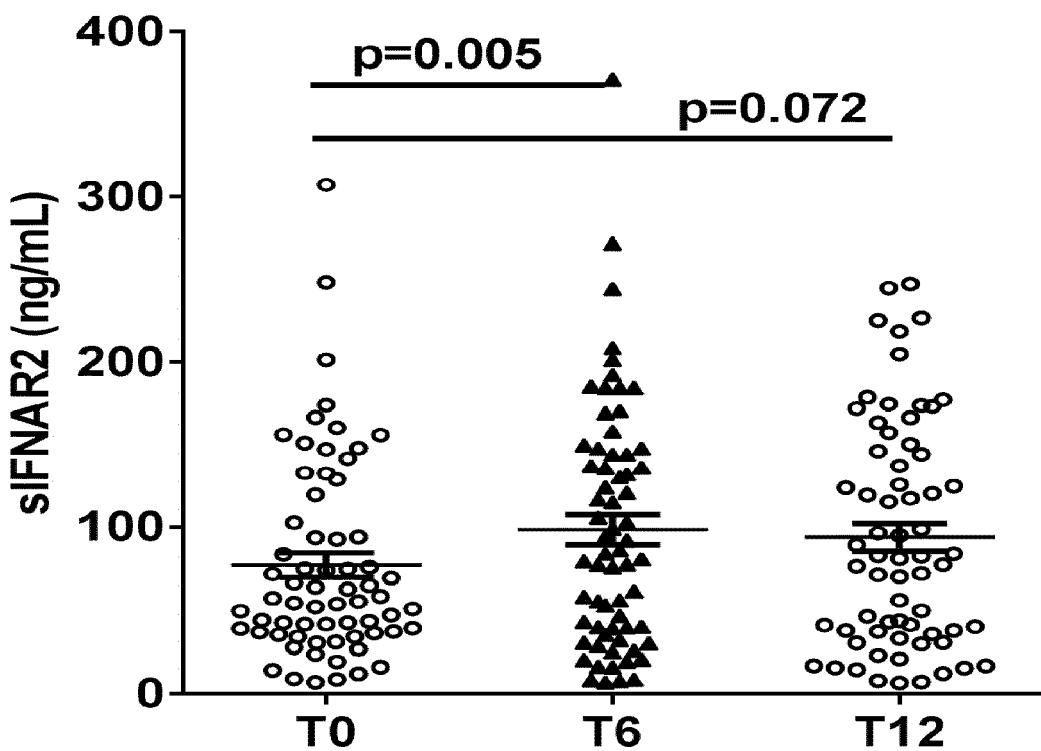


Fig. 5

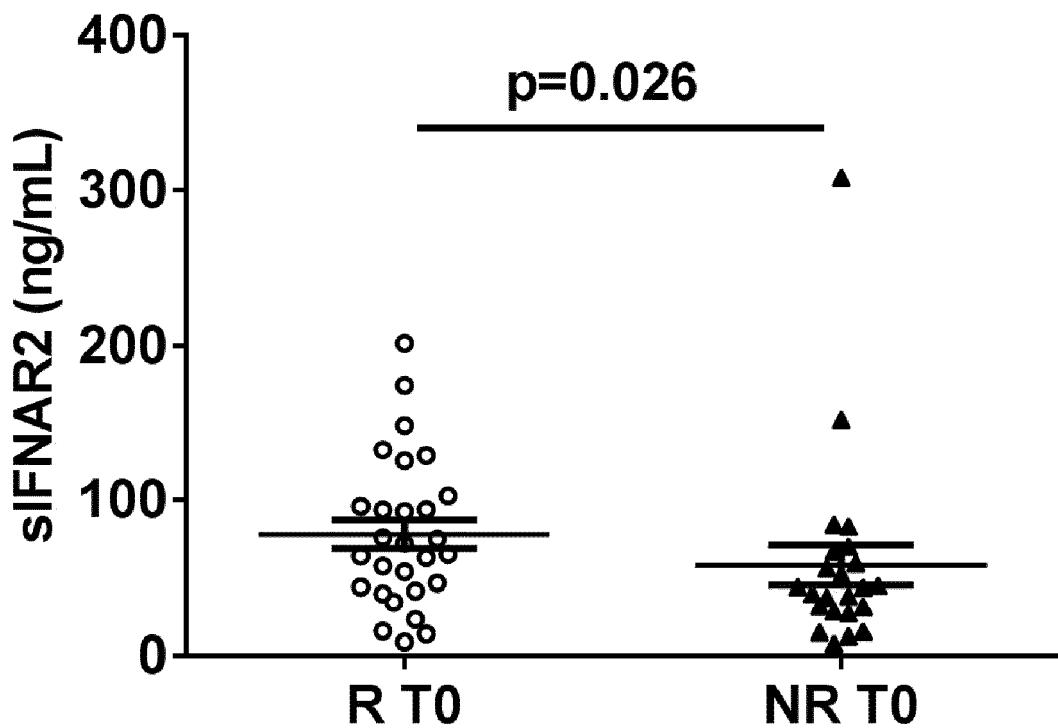


Fig. 6

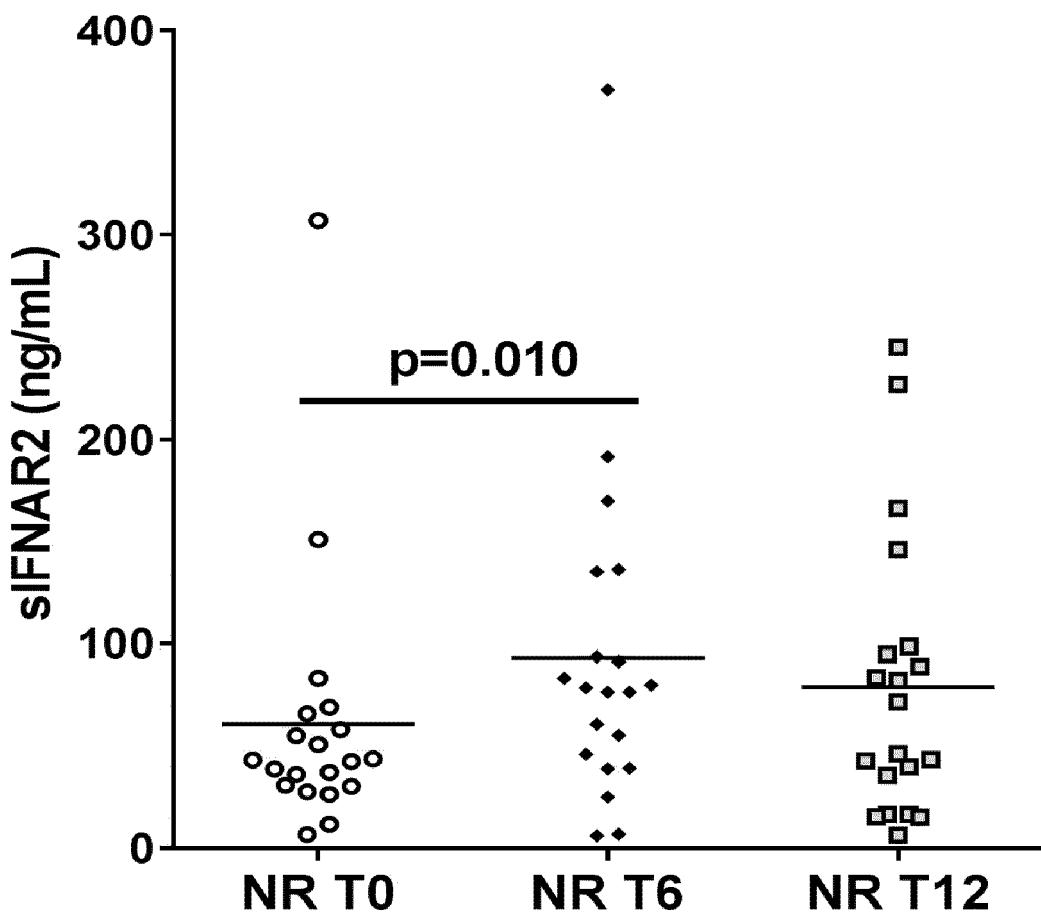


Fig. 7

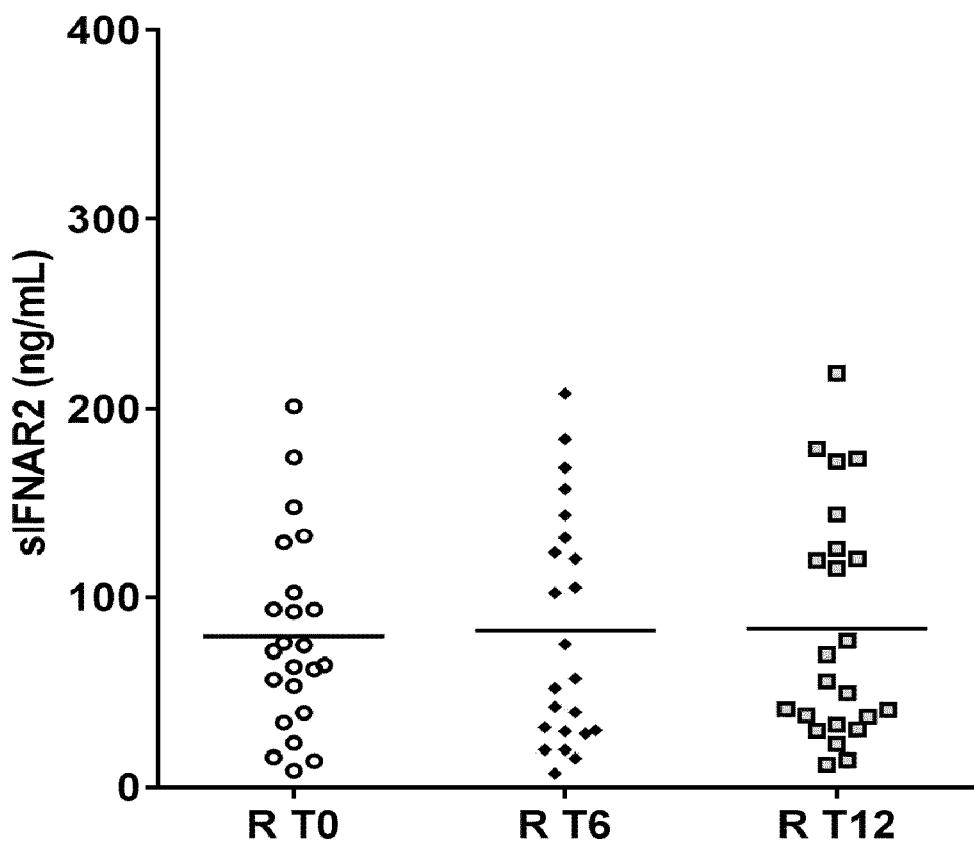


Fig. 8

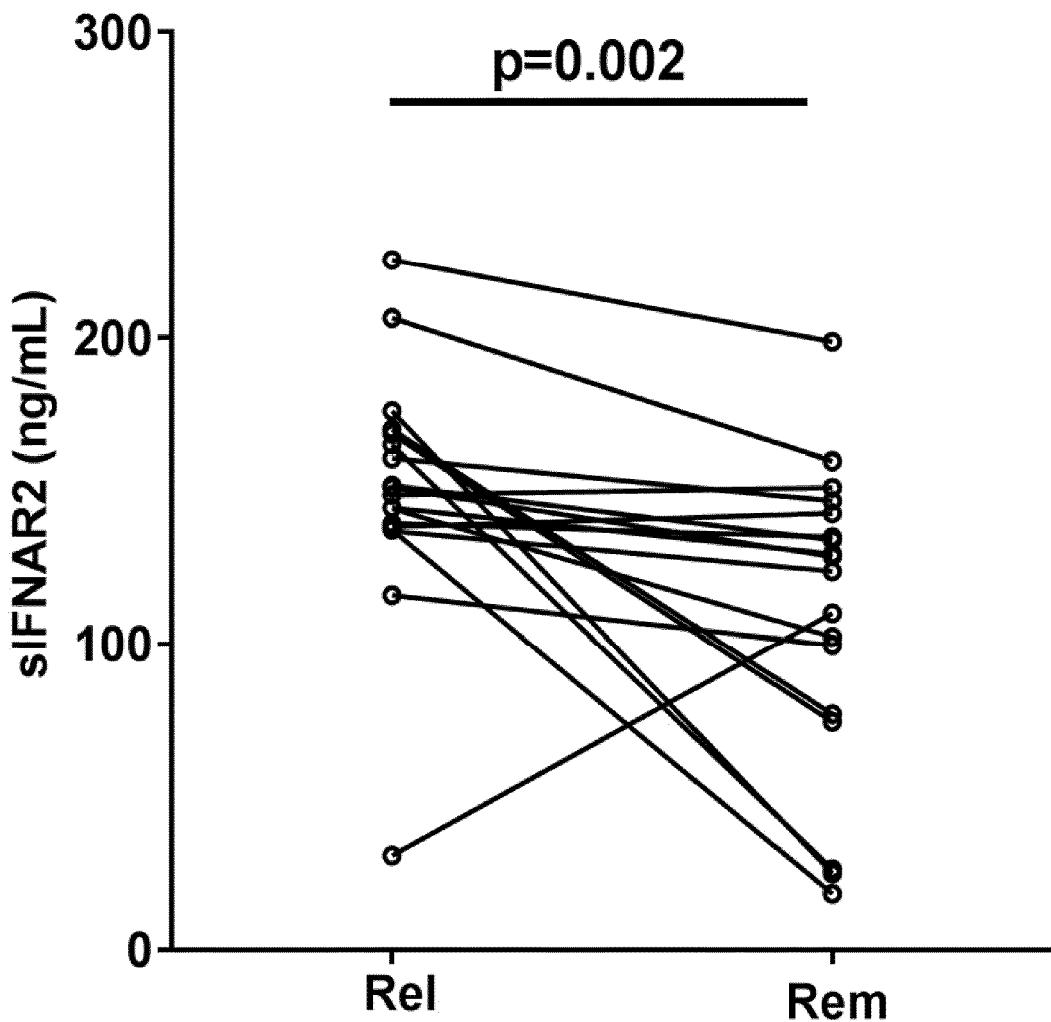


Fig. 9

