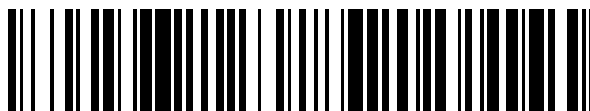


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 073 092**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

A61B 5/055 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2022** **PCT/EP2022/084300**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.06.2023** **WO23099773**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2022** **E 22830191 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2026** **EP 4441508**

54 Título: **Método in vitro para el diagnóstico y/o pronóstico de la esclerosis múltiple**

30 Prioridad:

02.12.2021 EP 21383087

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.07.2026

73 Titular/es:

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (20,00%)
Avda. de la Constitución, 18
41071 Sevilla, ES;
UNIVERSIDAD DE MALAGA (5,00%) y
ALA DIAGNOSTICS, S.L. (75,00%)

72 Inventor/es:

FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, ÓSCAR;
MONTERO MARTÍN-CALOTO, JOSÉ RAMÓN;
PAVÍA MOLINA, JOSÉ;
BARÓN LÓPEZ, FRANCISCO JAVIER;
OLIVER MARTOS, BEGOÑA;
HURTADO GUERRERO, ISAAC;
SERRANO CASTRO, PEDRO JESÚS y
ALONSO TORRES, ANA

74 Agente/Representante:

MARTÍNEZ, Miguel Ángel

ES 3 073 092 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 *in vitro* para el diagnóstico y/o pronóstico de la esclerosis múltiple

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la medicina. En particular, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico y/o pronóstico de la esclerosis múltiple (EM) en un sujeto que comprende la evaluación del nivel de concentración de sIFNAR2 en una muestra biológica obtenida del sujeto en combinación con la obtención de una imagen por resonancia magnética (IRM) para evaluar la presencia/ausencia de diseminación en el espacio (IRM_DS) y/o diseminación en el tiempo (IRM_DT).

Estado de la técnica

La EM es una enfermedad inflamatoria, desmielinizante y neurodegenerativa que afecta a individuos con una predisposición genética que han estado expuestos a un agente desconocido, muy probablemente infeccioso, que desencadena un proceso autoinmunitario dirigido contra la mielina que rodea los axones en el sistema nervioso central (SNC), provocando múltiples lesiones en diversas localizaciones. Esto da lugar a una amplia gama de síntomas, lo que implica una importante variabilidad clínica que dificulta el diagnóstico. La EM afecta a 2,8 millones de pacientes en todo el mundo, por lo que es la causa más frecuente de discapacidad no traumática en adultos jóvenes. La incidencia puede variar, entre 2-8/100.000 habitantes, dependiendo del país.

Hasta la fecha, se han identificado varios fenotipos clínicos, desde la forma clínica más temprana, es decir, cuando aparece la primera manifestación clínica característica de la enfermedad (neuritis óptica, síndrome del tronco cerebral o lesión medular incompleta), conocida como síndrome clínicamente aislado (SCA). Si el paciente presenta otro episodio de actividad clínica o de actividad en la imagen por resonancia magnética (IRM), ya sea en forma de lesiones que captan gadolinio (Gad+) en la secuencia de IRM ponderada en T1 o en forma de lesiones nuevas o agrandadas en la secuencia de IRM ponderada en T2 (lesiones activas), entonces el paciente ha entrado en la fase de EM recurrente-remitente (EMRR), caracterizada por episodios recurrentes de actividad clínica (reagudizaciones y recaídas) o de actividad en la IRM, con o sin recuperación completa o con secuelas posteriores. Tras 10-15 años de progresión, aproximadamente el 80 % de los pacientes pasan a una fase en la que generalmente se produce una lenta progresión de la discapacidad, con o sin empeoramiento clínico o reagudizaciones. Esta fase se conoce como EM secundaria progresiva (EMSP). Aproximadamente el 90 % de los pacientes presentan este patrón de progresión. Un 10 % de los pacientes presentan una evolución progresiva de la discapacidad desde el inicio de la enfermedad, con o sin reagudizaciones superpuestas, una forma clínica conocida como EM primaria progresiva (EMPP).

Además de las formas clínicas mencionadas, algunas personas que por diversas razones se han sometido a una imagen por resonancia magnética, muestran lesiones características de la EM dentro del SNC, principalmente en el cerebro. Por lo tanto, se trata de una forma preclínica conocida como síndrome radiológicamente aislado (RIS). Se ha observado que muchas de estas personas pueden tener datos que sugieren un cierto nivel de neurodegeneración, lo que puede sugerir que la enfermedad está activa incluso años antes de que aparezca la primera manifestación clínica neurológica.

Por último, en los últimos años se ha observado, a través de estudios retrospectivos, que los pacientes con EM visitan a su médico con mayor frecuencia que los controles sanos, debido a diversas afecciones o molestias, no claramente relacionadas con el SNC, habiéndose acuñado el término "EM prodrómica", que significa que el inicio de la EM se produciría realmente muchos años antes de las primeras manifestaciones clínicas. Esto es de especial relevancia, ya que para conocer la(s) causa(s) de la enfermedad, puede ser necesario examinar los acontecimientos ocurridos durante la adolescencia, presumiblemente la edad en la que aparecieron por primera vez las manifestaciones patogénicas que condujeron a o desencadenaron la EM.

A pesar del mayor conocimiento y concienciación de los médicos sobre la EM, el diagnóstico sigue siendo un reto, incluso para los neurólogos experimentados. Actualmente, ninguna prueba es específica al 100 % para el diagnóstico de la EM, y la identificación de biomarcadores precisos es un reto debido a las complejidades clínicas y fisiopatológicas de la enfermedad.

Por lo tanto, existe una necesidad médica insatisfecha de encontrar estrategias fiables que puedan usarse para el diagnóstico de la EM con la mayor sensibilidad y especificidad posibles.

La presente invención se centra, por lo tanto, en resolver este problema y, en consecuencia, se proporciona una estrategia fiable capaz de diagnosticar la EM con una sensibilidad y especificidad mejoradas en comparación con las técnicas estándar actuales.

MARTINELLI V ET AL: "Multiple biomarkers improve the prediction of multiple sclerosis in clinically isolated syndromes", ACTA NEUROLOGICA SCANDINAVICA, MUNKSGAARD, COPENHAGEN, DK, vol. 136, n.º 5, 9 de abril de 2017 (09-04-2017), páginas 454-461, XP071063087, ISSN: 0001-6314, DOI: 10.1111/ANE.12761 divulgan que la

combinación de variables y biomarcadores, que incluye la IRM (imagen por resonancia magnética), datos de líquido cefalorraquídeo (LCR) y potenciales evocados mejoró el pronóstico de la esclerosis múltiple (EM) sobre criterios establecidos. Entre las variables de IRM, la diseminación en el tiempo fue el mejor predictor individual y la presencia de bandas oligoclonales (BOC) de IgG fue el biomarcador de líquidos más importante. También describe el efecto-tamaño de la combinación de múltiples biomarcadores.

El documento US 2016/011212 divulga el receptor soluble de IFN (interferón)-B (sIFNAR2) para su uso en el diagnóstico de la esclerosis múltiple, incluyendo en un kit. El documento también divulga la adición de otro marcador (por ejemplo, banda oligoclonal de IgG) a sIFNAR2 para mejorar la capacidad de discriminación y el diagnóstico de EM tal como se describe con otros biomarcadores. El documento también divulga la diseminación espacial y temporal de biomarcadores para confirmar la transición de pacientes desde el síndrome aislado clínicamente (CIS) a la esclerosis múltiple clínicamente definida (EMCD) y el uso de sIFNAR2 como biomarcador anterior para dicha transición.

Ninguno de los documentos de la técnica anterior citados divulga el efecto sinérgico inesperado observado en la presente invención cuando IFNAR2 se combinó con al menos IRM_DS y/o IRM_DT.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

La presente invención se centra en la evaluación de nuevas estrategias para el diagnóstico de la EM basadas en la determinación de los niveles de sIFNAR2 [Órpez-Zafra T, Pavía J, Pinto-Medel MJ, Hurtado-Guerrero I, Rodríguez-Bada JL, Martín Montañez E, Fernández Ó, Leyva L, Oliver-Martos B. Development and validation of an ELISA for quantification of soluble IFN- β receptor: assessment in multiple sclerosis. Bioanalysis. 2015;7(22):2869-2880] y [Órpez-Zafra T, Pavía J, Hurtado-Guerrero I, Pinto-Medel MJ, Rodríguez Bada JL, Urbaneja P, Suardíaz M, Villar LM, Comabella M, Montalbán X, Álvarez-Cermeño JC, Leyva L, Fernández Ó, Oliver-Martos B. Decreased soluble IFN- β receptor (sIFNAR2) in multiple sclerosis patients: A potential serum diagnostic biomarker. Mult Scler. Junio de 2017;23(7):937-945], en combinación con otros parámetros clínicos o paraclínicos.

En particular, el objetivo principal de la presente invención es mejorar la sensibilidad y especificidad asociadas al uso de sIFNAR2 como biomarcador único para el diagnóstico de la EM. En consecuencia, en la presente invención, se usó la regresión logística y discriminante de variables demográficas, clínicas y paraclínicas, como la IRM, las bandas oligoclonales IgG (BOC IgG) en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y los potenciales evocados (PE), con el fin de mejorar la sensibilidad y especificidad diagnóstica de sIFNAR2 como biomarcador encontrado en el suero de pacientes con EM sin tratamiento frente a los controles sanos.

Así, se analizaron las interacciones multiparamétricas entre sIFNAR2 y cada una de las siguientes variables

- Datos demográficos del paciente (edad, sexo y otros datos).
- Datos de la enfermedad inicial (reagudizaciones en el año anterior, discapacidad inicial -en el momento de la recogida de la muestra- puntuación EDSS, años de progresión de la EM).
- Datos del líquido cefalorraquídeo (LCR) (BOC IgG + o -).
- Datos de IRM, ya sea inicial o previa, como una IRM realizada en los 12 meses anteriores (criterios de diseminación espacial (SD) / diseminación temporal (TD) evaluados por un experto en esclerosis múltiple).
- Datos de los potenciales evocados visuales (PEV) (latencia: valor) del ojo derecho (OD) y del ojo izquierdo (OI).

Para ello, se seleccionó un número de pacientes (43) y de controles (43) por muestreo aleatorio asegurando que los niveles de biomarcadores coinciden con los datos del estudio de referencia [Órpez-Zafra T, Pavía J, Hurtado-Guerrero I, Pinto-Medel MJ, Rodríguez Bada JL, Urbaneja P, Suardíaz M, Villar LM, Comabella M, Montalbán X, Álvarez-Cermeño JC, Leyva L, Fernández Ó, Oliver-Martos B. Decreased soluble IFN- β receptor (sIFNAR2) in multiple sclerosis patients: A potential serum diagnostic biomarker. Mult Scler. Junio de 2017;23(7):937-945].

Posteriormente, se obtuvieron datos demográficos, clínicos y paraclínicos (IRM, LCR, PEV) (tabla 1). La tabla 1 muestra que los pacientes con EM son representativos de la enfermedad (edad, género) y mostraron actividad clínica dentro del año anterior como reagudizaciones ($1,0 \pm 0,9$) con una puntuación EDSS en el momento de la medición que indica una fase temprana de la enfermedad (media EDSS $\pm$ DE: $1,6 \pm 1,4$), aunque el intervalo EDSS de 0,0 - 6,5 cubre un amplio espectro de discapacidad en los pacientes con EM.

Los resultados del análisis de regresión logística para las variables incluidas en el estudio se enumeran en la tabla 2. Cabe destacar que los datos clínicos y de sIFNAR2 no mostraron diferencias significativas para SE/ES/VPP/VPN frente al estudio de referencia [Órpez-Zafra T, Pavía J, Hurtado-Guerrero I, Pinto-Medel MJ, Rodríguez Bada JL, Urbaneja P, Suardíaz M, Villar LM, Comabella M, Montalbán X, Álvarez-Cermeño JC, Leyva L, Fernández Ó, Oliver-

Martos B. Decreased soluble IFN- β receptor (sIFNAR2) in multiple sclerosis patients: A potential serum diagnostic biomarker. Mult Scler. Junio de 2017;23(7):937-945] confirmando que se seleccionó la submuestra correcta mediante un remuestreo aleatorio.

5 Tal y como se muestra en la tabla 2, la combinación de IFNAR2 con cualquiera de las siguientes variables IRM_DS, IRM_DT o [IRM_DS+IRM_DT] siempre dio lugar a un valor de AUC mejorado (entre 0,91 y 0,95) en comparación tanto con el AUC asociado al uso de IFNAR2 solo (0,82) como con el AUC asociado a IRM_DS (0,79) o [IRM_DS+IRM_DT] (0,80).

10 Así, se observó un efecto sinérgico inesperado cuando se combinó IFNAR2 al menos con IRM_DS y/o IRM_DT. Estos resultados son de máxima relevancia clínica ya que, aunque la IRM es la prueba de referencia para el diagnóstico de la EM en la práctica clínica, tiene una sensibilidad de alrededor del 80 % y es, a su vez, la causa de gran parte de los errores de diagnóstico asociados a la enfermedad. Sin embargo, la combinación de la IRM con los niveles de sIFNAR2 ofrece un efecto sinérgico capaz de mejorar los valores de AUC individuales tanto de la IRM como de sIFNAR2, y
15 puede ser la base de una prueba específica para el diagnóstico de la EM.

Además, cuando se combinaron los valores de PEV con IFNAR2 y [IRM_DS y/o IRM_DT], también se obtuvieron altos valores de AUC. Véanse, por ejemplo, las combinaciones de IFNAR2 con [IRM_DS+PEV], [IRM_DT+PEV] o [IRM_DS+IRM_DT+PEV] en la tabla 2, que muestran valores de AUC entre 0,93 y 0,95.

20 Por último, cuando se incluyó la evaluación de la presencia de BOC_IgG en las combinaciones, se obtuvieron valores de AUC aún mayores. Véanse, por ejemplo, las combinaciones de IFNAR2 con [IRM_DS+PEV+BOC_IgG] o [IRM_DS+IRM_DT+PEV+BOC_IgG] en la tabla 2, que muestran un AUC = 0,99).

25 Así, la primera realización de la presente invención se refiere a un método *in vitro* (en adelante en el presente documento "método de la invención") para el diagnóstico y/o pronóstico de la EM en un sujeto, que comprende evaluar el nivel de concentración de sIFNAR2 en una muestra biológica obtenida del sujeto en combinación con la obtención de una IRM para evaluar la presencia/ausencia de IRM_DS y/o IRM_DT (o una combinación con los datos obtenidos de la IRM), donde la identificación de un nivel inferior de sIFNAR2 en comparación con un nivel umbral preestablecido, y la presencia de IRM_DS y/o IRM_DT, son indicaciones de que el sujeto padece EM.

En una realización preferida, se realiza una IRM para evaluar la presencia de IRM_DS que significa que se han producido lesiones inflamatorias en más de una localización ya predefinida en el sistema nervioso central y/o para evaluar la presencia de IRM_DT que significa que se han desarrollado nuevas lesiones en el curso de la enfermedad. Véase el artículo [Alan J Thompson *et al.*, 2017. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. Lancet Neurol. Febrero de 2018;17(2):162-173. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2. Epub 2017 de Dic 21] que muestra los criterios de McDonald para la demostración de la diseminación en el espacio y en el tiempo por IRM en un paciente con un síndrome clínicamente aislado. La diseminación en el espacio puede demostrarse por una o más lesiones hiperintensas en T2 que son características de la esclerosis múltiple en dos o más de cuatro áreas del SNC: regiones cerebrales periventriculares, corticales o yuxtacorticales e infratentoriales, y la médula espinal. La diseminación en el tiempo puede demostrarse por la presencia simultánea de lesiones que realzan con gadolinio y de lesiones que no realzan con gadolinio en cualquier momento o por una nueva lesión hiperintensa en T2 o que realza con gadolinio en la IRM de seguimiento, con referencia a una exploración de referencia, independientemente del momento de la IRM de referencia.

45 En una realización preferida de la presente invención, el método de la invención comprende evaluar el nivel de concentración de sIFNAR2 en una muestra biológica obtenida de un paciente que muestra rasgos clínicos y/o radiológicos indicativos de EM y se caracteriza por la presencia de IRM_DS y/o IRM_DT identificadas por IRM.

50 En una realización preferida, el método de la invención comprende además la evaluación de los valores de PEV.

En una realización preferida, los valores de PEV se determinan analizando la latencia, la morfología y/o la amplitud de cualquiera de las deflexiones P-100, N-75 y N-145. En una realización preferida, los valores de PEV se determinan preferiblemente analizando la latencia de la deflexión P-100, en la que una latencia de PEV retrasada, en comparación con un valor de latencia de PEV preestablecido, es una indicación de que el paciente padece EM. En una realización aún preferida, el valor de latencia de PEV preestablecido se obtiene de sujetos sanos. Normalmente, una latencia de PEV superior a 111,1 milisegundos es una indicación de que el paciente puede padecer EM.

60 En una realización preferida, el método de la invención comprende además evaluar la presencia o ausencia de BOC_IgG, donde la presencia de al menos dos BOC_IgG en el LCR, no presentes en suero, es una indicación de que el paciente puede padecer EM.

En una realización preferida, el método de la invención comprende además procesar el nivel de concentración de sIFNAR2, la información obtenida de las imágenes de IRM respecto a la presencia de IRM_DS y/o IRM_DT, los valores de PEV, y la información sobre la presencia de al menos dos BOC_IgG en LCR, no presentes en suero, para definir

una puntuación de riesgo, en la que si se identifica una desviación o variación del valor de la puntuación de riesgo, en comparación con un valor de referencia, esto es indicativo de que el paciente padece EM.

En una realización preferida de la presente invención, la determinación del nivel de concentración de sIFNAR2 se lleva a cabo en una muestra biológica, preferiblemente un líquido biológico seleccionado de sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, orina o lágrimas.

En una realización preferida de la presente invención, la determinación del nivel de concentración de sIFNAR2 se lleva a cabo mediante un inmunoensayo, preferiblemente mediante una técnica seleccionada de: inmunotransferencia, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, mapa x, microchips de proteínas o ELISA basado en aptámeros, o cualquier técnica para la determinación del nivel de concentración de sIFNAR2 en una muestra biológica.

En una realización preferida de la presente invención, comprende además: a) recibir mediante un programa informático el nivel de concentración de sIFNAR2, la información sobre la presencia de IRM_DS y/o IRM_DT, los valores de PEV y la información sobre la presencia de al menos dos BOC_IgG en el LCR, no presentes en suero; b) procesar la información recibida según la etapa a) para encontrar variaciones o desviaciones sustanciales con respecto a la información obtenida de un sujeto sano, y c) proporcionar una salida a través de un elemento de visualización de terminal cuando se encuentra una variación o desviación que indica que el sujeto podría padecer EM.

La segunda realización de la presente invención se refiere al uso *in vitro* de sIFNAR2, en combinación con las variables IRM_DS y/o IRM_DT medidas por IRM, para el diagnóstico y/o pronóstico de la EM.

Una realización preferida de la presente invención se refiere al uso *in vitro* de sIFNAR2 en combinación con las variables IRM_DS y/o IRM_DT medidas por IRM; y en combinación con los valores de PEV.

Una realización preferida de la presente invención se refiere al uso *in vitro* de sIFNAR2 en combinación con variables IRM_DS y/o IRM_DT medidas por IRM; y en combinación con los valores de PEV y al menos dos BOC_IgG en LCR, no presentes en suero.

La última realización de la presente invención se refiere a un método para tratar a un paciente que padece EM (en el que el tratamiento se centra normalmente en acelerar la recuperación de los ataques, ralentizar la progresión de la enfermedad y controlar los síntomas de la EM) o, alternativamente, evaluar el tratamiento que debe aplicarse a un paciente que padece EM, en el que se le ha diagnosticado al paciente usando el método de la invención.

A efectos de la presente invención, se definen los siguientes términos:

- El término "que comprende" significa que incluye, pero no se limita a, lo que sigue a la palabra "que comprende". Así, el uso del término "que comprende" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden estar o no presentes.

- El término "que consiste en" significa que incluye, y se limita a, lo que sigue a la frase "que consiste en". Por lo tanto, la frase "que consiste en" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios y que no pueden estar presentes otros elementos.

- La expresión "nivel umbral preestablecido" normalmente se refiere al nivel medido en pacientes sanos. Es probable que el paciente padezca EM con una sensibilidad y especificidad determinadas si los niveles del biomarcador en el paciente están por encima de dicho "nivel umbral preestablecido". Un "valor umbral" o "valor de corte" puede determinarse de forma experimental, empírica o teórica. Un "valor umbral" también puede seleccionarse arbitrariamente basándose en las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, como reconocería un experto medio en la técnica. El "valor umbral" debe determinarse para obtener la sensibilidad y la especificidad óptimas según la función de la prueba y el balance beneficio/riesgo (consecuencias clínicas de los falsos positivos y los falsos negativos). Preferiblemente, el experto en la técnica puede comparar el nivel del biomarcador obtenido según el método de la invención con un "valor umbral" definido. En una realización de la presente invención, el "valor umbral" se deriva del nivel del biomarcador determinado en una muestra de control derivada de uno o más sujetos que están sustancialmente sanos. En una realización de la presente invención, el "valor umbral" también puede derivarse del nivel del biomarcador determinado en una muestra de control derivada de uno o más sujetos que padecen EM. Además, la medición retrospectiva del nivel del biomarcador en muestras históricas de sujetos debidamente almacenadas puede usarse para establecer estos "valores umbral". Normalmente, la sensibilidad y la especificidad óptimas (y, por tanto, el "valor umbral") pueden determinarse mediante una curva ROC (curva de eficacia diagnóstica) basada en datos experimentales. Por ejemplo, después de determinar los niveles del biomarcador en un grupo de referencia, puede usarse un análisis algorítmico para el tratamiento estadístico de las concentraciones medidas de los biomarcadores en las muestras biológicas que se van a someter a prueba, y así obtener un criterio de clasificación que tenga importancia para la clasificación de las muestras. El nombre completo de la curva ROC es curva de eficacia diagnóstica, que también se conoce como curva de rendimiento diagnóstico. Se usa principalmente para las pruebas de diagnóstico bioquímico clínico. La curva ROC es un indicador completo que refleja las variables continuas de la

tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) y la tasa de falsos positivos (1-especificidad). Revela la relación entre la sensibilidad y la especificidad con el método de composición de la imagen. Una serie de diferentes valores de corte (umbrales o valores críticos, valores límite entre los resultados normales y anómalos de la prueba diagnóstica) se establecen como variables continuas para calcular una serie de valores de sensibilidad y especificidad. A continuación, se usa la sensibilidad como coordenada vertical y la especificidad como coordenada horizontal para trazar una curva. Cuanto mayor sea el área bajo la curva (AUC), mayor será la precisión del diagnóstico. En la curva ROC, el punto más cercano al extremo superior izquierdo del diagrama de coordenadas es un punto crítico que tiene valores altos de sensibilidad y especificidad. El valor de AUC de la curva ROC se sitúa entre 1,0 y 0,5. Cuando el AUC > 0,5, el resultado del diagnóstico es cada vez mejor a medida que el AUC se acerca a 1. Cuando el AUC se sitúa entre 0,5 y 0,7, la precisión es baja. Cuando el AUC se sitúa entre 0,7 y 0,9, la precisión es moderada. Cuando el AUC es superior a 0,9, la precisión es bastante alta. Este método algorítmico se realiza preferiblemente con un ordenador. Para el trazado de la curva ROC pueden usarse programas o sistemas existentes en la técnica.

Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra las curvas ROC que representan el valor de AUC para cada una de las siguientes firmas. Eje X (Especificidad). Eje Y (Sensibilidad).

A) [IFNAR2] > AUC = 0,82.

B) [IFNAR2+IRM_DS] > AUC = 0,91.

C) [IFNAR2+IRM_DS+PEV] > AUC = 0,95.

D) [IFNAR2+IRM_DS+IRM_DT+PEV] > AUC = 0,95.

E) [IFNAR2+IRM_DS+PEV+BOC] > AUC = 0,99.

F) [IFNAR2+IRM_DS+IRM_DT+PEV+BOC] > AUC = 0,99.

G) [IFNAR2+PEV] > AUC = 0,93.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se ilustra mediante los ejemplos que se exponen a continuación, sin que se pretenda limitar su ámbito de protección.

Ejemplo 1. Material y métodos

Ejemplo 1.1. Selección de muestras

Se han seleccionado mediante un remuestreo aleatorio de una submuestra de datos de 43 pacientes no tratados y 43 controles sanos que participaron en un estudio anterior referenciado, buscando muestras de datos que tengan valores medios de sIFNAR2 similares a los que se notificaron en la publicación de referencia [Órpez-Zafra T, Pavía J, Hurtado-Guerrero I, Pinto-Medel MJ, Rodríguez Bada JL, Urbaneja P, Suardíaz M, Villar LM, Comabella M, Montalbán X, Álvarez-Cermeño JC, Leyva L, Fernández Ó, Oliver-Martos B. Decreased soluble IFN- β receptor (sIFNAR2) in multiple sclerosis patients: A potential serum diagnostic biomarker. Mult Scler. Junio de 2017;23(7):937-945].

Se construyó una base de datos que incluía datos demográficos y clínicos. Los datos se obtuvieron a partir de las historias clínicas y el análisis de los exámenes paraclínicos (IRM, PEV y LCR) de los 43 pacientes y 43 controles. Los datos de sIFNAR2 de los pacientes y controles seleccionados se obtuvieron del estudio de referencia [Órpez-Zafra T, Pavía J, Hurtado-Guerrero I, Pinto-Medel MJ, Rodríguez Bada JL, Urbaneja P, Suardíaz M, Villar LM, Comabella M, Montalbán X, Álvarez-Cermeño JC, Leyva L, Fernández Ó, Oliver-Martos B. Decreased soluble IFN- β receptor (sIFNAR2) in multiple sclerosis patients: A potential serum diagnostic biomarker. Mult Scler. Junio de 2017;23(7):937-945].

Ejemplo 1.2. Estadísticas

Se realizó un análisis multivariante por regresión logística y discriminante de las variables demográficas, clínicas y paraclínicas (IRM, LCR, PEV) incluidas en el estudio para obtener los mejores predictores de sIFNAR2 y del resto de marcadores (sensibilidad (SE), especificidad (SP), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN)), cada uno de ellos por separado y en diversas combinaciones. Se usó el área bajo la curva (AUC) - curva ROC para seleccionar los mejores modelos clasificadores, con el fin de mejorar la SE y SP diagnósticas de sIFNAR2 como biomarcador en el suero de pacientes con EM sin tratamiento frente a controles sanos. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Para la sensibilidad y especificidad de la IRM, se obtuvieron datos de una publicación de referencia [Barkhof F, Filippi M, Miller DH *et al.* Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain* 1997;120(Pt11):2059-2069] y para BOC-IgG en LCR se obtuvieron de [Abaira V, Álvarez-Cermeño JC, Arroyo R, Cámara C, Casanova B, Cubillo S, *et al.* Utility of oligoclonal IgG band detection for MS diagnosis in daily clinical practice. *J Immunol Methods*. 2011 Ago 31;371(1-2):170-173]. Para los valores de PEV en los controles, se obtuvieron datos de 43 sujetos sanos usados como valores de referencia de normalidad por el Laboratorio de Neurofisiología Clínica del HRUM y de una publicación de referencia [Thabit1 MN, Farouk MM, Awni M, Mohamed AB. Early disability in ambulatory patients with multiple sclerosis: optical coherence tomography versus visual evoked potentials, a comparative study. *Egyptian J Neurol, Psychiat and Neurosurg* (2020) 56:70]. Para todas las variables, se mantuvieron todos los valores obtenidos en la HRUM, incluidos los valores extremos y evitando cualquier manipulación de los datos.

Ejemplo 1.3. Consideraciones éticas sobre el tratamiento de los datos personales

Este estudio se ha realizado con la aprobación previa del CEI del centro de estudio (Hospital Regional Universitario de Málaga - HRUM), siguiendo las directrices de la Declaración de Helsinki, 1964, el Informe Belmont, 1978, el Reglamento de la UE 2016/679 de Protección de Datos (RGPD), la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de protección de datos de carácter personal y garantía de los derechos digitales (LOPDGDD) y el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y tratamiento de muestras biológicas de origen humano y por el que se regula el funcionamiento del Registro Nacional de Biobancos con fines de investigación biomédica, la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, la Ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica, las normas de Buena Práctica Clínica (BPC) de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH), así como cualquier otra norma y/o ley aplicable.

Ejemplo 2. Resultados

Ejemplo 1. Resultados demográficos, clínicos y paraclínicos

Los resultados demográficos, clínicos y paraclínicos se muestran en la tabla 1 (véase más abajo). Los datos incluidos en la tabla 1 muestran una población típica de pacientes con EM en términos demográficos: edad 37,8 (13,9), mujer 60,5 %. EDSS inicial 1,6 (1,4), intervalo 0,0-6,5.

Tabla 1

Variable	PACIENTES (N = 43)	CONTROLES (N = 43)	Total (N=86)	valor de p
Edad				
N-faltantes	0,0	43,0	43,0	
Media (DE)	37,8 (13,9)	N/A	37,8 (13,9)	
Intervalo	14,0 - 66,0	N/A	14,0 - 66,0	
Sexo				
N-faltantes	0,0	43,0	43,0	
Hombre	17,0 (39,5 %)	0,0	17,0 (39,5 %)	
Mujer	26,0 (60,5 %)	0,0	26,0 (60,5 %)	
Agudizaciones				
N-faltantes	2,0	43,0	45,0	
Media (DE)	1,0 (0,9)	N/A	1,0 (0,9)	
Intervalo	0,0-3,0	N/A	0,0-3,0	
EDSS inicial				
N-faltantes	7,0	43,0	50,0	
Media (DE)	1,6 (1,4)	N/A	1,6 (1,4)	
Intervalo	0,0-6,5	N/A	0,0 - 6,5	
PEV_MÁS ALTOS				<0,0011
Media (DE)	114,9 (11,0)	100,8 (6,6)	107,8 (11,5)	
Intervalo	91,0 - 150,0	88,7 - 112,1	88,7 - 150,0	
MPEV				<0,0011
N-faltantes	5,0	0,0	5,0	
Media (DE)	111,0 (10,0)	98,0 (6,5)	104,1 (10,5)	
Intervalo	81,5 -135,0	86,7 -110,0	81,5 -135,0	
PEV_PC111.1				<0,0012
N-faltantes	5,0	0,0	5,0	
1	16,0 (42,1 %)	42,0 (97,7 %)	58,0 (71,6 %)	
2 Anómalo	22,0 (57,9 %)	1,0 (2,3 %)	23,0 (28,4 %)	
IRM_DS				<0,0012
0,0	6,0 (14,0 %)	34,0 (79,1 %)	40,0 (46,5 %)	
0,8	13,0 (30,2 %)	0,0 (0,0 %)	13,0 (15,1 %)	
1,0 Sí	24,0 (55,8 %)	9,0 (20,9 %)	33,0 (38,4 %)	
IRM_DT				<0,0012
0,000	13,0 (30,2 %)	26,0 (60,5 %)	39,0 (45,3 %)	
0,581	12,0 (27,9 %)	0,0 (0,0 %)	12,0 (14,0 %)	
1,000 Sí	18,0 (41,9 %)	17,0 (39,5 %)	35,0 (40,7 %)	
BOC_IgG				<0,0012
1,000 Positivo	37,0 (86,0 %)	3,0 (7,0 %)	40,0 (46,5 %)	
1,075	3,0 (7,0 %)	0,0 (0,0 %)	3,0 (3,5 %)	
2,000	3,0 (7,0 %)	40,0 (93,0 %)	43,0 (50,0 %)	

1. ANOVA de modelo lineal. 2. Prueba de chi cuadrado de Pearson

Para los valores de PEV en los controles, se usaron los datos de 43 sujetos sanos usados como referencia por el Laboratorio de Neurofisiología Clínica del HRUM y una publicación de referencia para establecer el umbral de normalidad [Thabit1 MN, Farouk MM, Awni M, Mohamed AB. Early disability in ambulatory patients with multiple sclerosis: optical coherence tomography versus visual evoked potentials, a comparative study. Egyptian J Neurol, Psychiat and Neurosurg (2020) 56:70], que se estableció como la media $\pm$ 2DE, como se especifica en la bibliografía. La latencia de PEV más alta (incluyendo OD y OI) para los pacientes fue de 114,9 (11,0), y para los controles fue de 100,8 (6,6). La latencia de PEV media de los pacientes fue de 111,0 (10,0), y la de los controles fue de 98,0 (6,5). Los pacientes mostraron un umbral PEV_PC111_1 anómalo (latencia $111 \pm 2DE$) en el 57,9 % de los casos, mientras que los controles sólo mostraron un umbral anómalo en el 2,3 % de los casos.

Para los datos de IRM y LCR de los controles, se usaron los datos de SE y SP de dos estudios de referencia publicados [Barkhof F, Filippi M, Miller DH et al. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. Brain 1997;120(Pt11):2059-2069] y [Abraira V, Álvarez-Cermeño JC, Arroyo R, Cámara C, Casanova B, Cubillo S, et al. Utility of oligoclonal IgG band detection for MS diagnosis in daily clinical practice. J Immunol Methods. 2011 Ago 31;371(1-2):170-173].

Se han mantenido todos los valores obtenidos en el HRUM para todas las variables, incluidos los valores extremos, evitando cualquier manipulación de los datos.

Ejemplo 2. Resultados del análisis de regresión logística de las variables paraclínicas

Los resultados del análisis de regresión logística de las variables paraclínicas se muestran en la tabla 2.

Tabla 2

Variable	AUC	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
IFNAR2	0,82	76,74	76,74	76,74	76,74
IRM_DS	0,79	86,05	79,07	80,43	85
IRM_DS+IRM_DT	0,80	86,05	79,07	80,43	85
IFNAR2+IRM_DS	0,91	90,70	76,74	79,59	89,19
IFNAR2+IRM_DT	0,91	93,02	79,07	81,63	91,89
IFNAR2+IRM_DS+IRM_DT	0,95	86,05	93,02	92,50	86,96
IFNAR2+IRM_DS+PEV	0,95	83,72	95,35	94,74	85,42
IFNAR2+IRM_DT+PEV	0,93	90,70	88,37	88,64	90,48
IFNAR2+IRM_DS+IRM_DT+PEV	0,95	86,05	93,02	92,50	86,96
IFNAR2+IRM_DS+IRM_DT+PEV+BOC_IgG	0,99	97,67	93,02	93,33	97,56
IFNAR2+IRM_DS+PEV+BOC_IgG	0,99	100	93,02	93,48	100
IFNAR2+ PEV	0,93	90,69	88,37	88,64	90,58

Los datos clínicos y de sIFNAR2 no mostraron diferencias significativas para SE/SP/VPP/VPN frente al estudio de referencia, [Órpez-Zafra T, Pavía J, Hurtado-Guerrero I, Pinto-Medel MJ, Rodríguez Bada JL, Urbaneja P, Suardíaz M, Villar LM, Comabella M, Montalbán X, Álvarez-Cermeño JC, Leyva L, Fernández Ó, Oliver-Martos B. Decreased soluble IFN- β receptor (sIFNAR2) in multiple sclerosis patients: A potential serum diagnostic biomarker. Mult Scler. Junio de 2017;23(7):937-945], confirmando que se seleccionó la submuestra correcta mediante un remuestreo aleatorio. Todos los valores de SE/ES/VPP/VPN oscilaron alrededor del 77 %.

Para los valores de PEV, el punto de corte se estableció como la media $\pm 2DE$ de los controles sanos (latencia de PEV_PC111.1=111,1 milisegundos), tal y como se describe en la bibliografía. Este valor es coherente con los datos publicados en la bibliografía [Thabit1 MN, Farouk MM, Awni M, Mohamed AB. Early disability in ambulatory patients with multiple sclerosis: optical coherence tomography versus visual evoked potentials, a comparative study. Egyptian J Neurol, Psychiat and Neurosurg (2020) 56:70].

Cuando el sIFNAR2 sérico y el PEV_PC111.1 se evaluaron conjuntamente con este punto de corte, los valores de SE/ES/VPP/VPN aumentaron hasta alrededor del 90 %.

Los valores de SE/ES/VPP/VPN aumentaron con el número de variables incluidas en el modelo predictivo y, como cabía esperar, la inclusión de los valores de BOC-IgG y los criterios de diseminación espacial de la IRM (IRM_DS) fue especialmente útil.

5 Tal y como se muestra en la tabla 2, la combinación de IFNAR2 con cualquiera de las siguientes variables IRM_DS, IRM_DT o [IRM_DS+IRM_DT] siempre dio lugar a un valor de AUC mejorado (entre 0,90 y 0,95) en comparación tanto con el AUC asociado al uso de IFNAR2 solo (0,82) como con el AUC asociado a IRM_DS (0,79) o [IRM_DS+IRM_DT] (0,80).

10 Así, se observó un efecto sinérgico inesperado cuando se combinó IFNAR2 al menos con IRM_DS y/o IRM_DT. Estos resultados son de máxima relevancia clínica ya que, aunque la IRM es la prueba de referencia para el diagnóstico de la EM en la práctica clínica, tiene una sensibilidad de alrededor del 80 % y es, a su vez, la causa de gran parte de los errores de diagnóstico asociados a la enfermedad. Sin embargo, la combinación de la IRM con los niveles de sIFNAR2 ofrece un efecto sinérgico capaz de mejorar los valores de AUC individuales tanto de la IRM como de sIFNAR2, y
15 puede ser la base de una prueba específica para el diagnóstico de la EM.

Además, cuando se combinaron los valores de PEV con IFNAR2 y [IRM_DS y/o IRM_DT], también se obtuvieron altos valores de AUC. Véanse, por ejemplo, las combinaciones de IFNAR2 con [IRM_DS+PEV], [IRM_DT+PEV] o [IRM_DS+IRM_DT+PEV] en la tabla 2, que muestran valores de AUC de entre 0,93 y 0,95.

20 Por último, cuando se incluyó en las combinaciones la evaluación de la presencia de BOC-IgG en el LCR, se obtuvieron valores de AUC aún mayores. Véanse, por ejemplo, las combinaciones de IFNAR2 con [IRM_DS+PEV+BOC-IgG] o [IRM_DS+IRM_DT+PEV+BOC-IgG] en la tabla 2, que muestran un AUC = 0,99).

25

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para el diagnóstico y/o pronóstico de la esclerosis múltiple (EM) en un sujeto, que comprende evaluar el nivel de concentración de sIFNAR2 en una muestra biológica obtenida del sujeto en combinación con la obtención de una imagen por resonancia magnética (IRM) para evaluar la presencia/ausencia de diseminación en el espacio (IRM_DS) y/o diseminación en el tiempo (IRM_DT), en el que la identificación de un nivel inferior de sIFNAR2 en comparación con un nivel umbral preestablecido, y la presencia de IRM_DS y/o IRM_DT, son indicaciones de que el sujeto padece EM.
2. Método *in vitro*, según la reivindicación 1, que comprende evaluar el nivel de concentración de sIFNAR2 en una muestra biológica obtenida de un paciente, en el que el paciente presenta rasgos clínicos y/o radiológicos indicativos de EM y se caracteriza por la presencia de IRM_DS y/o IRM_DT identificadas por IRM.
3. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la evaluación de valores de potencial evocado visual (PEV).
4. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la evaluación de la presencia o ausencia de bandas oligoclonales de IgG (BOC_IgG) en LCR.
5. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además procesar el nivel de concentración de sIFNAR2, la información obtenida de las imágenes de IRM sobre la presencia de IRM_DS y/o IRM_DT, los valores de PEV y la información sobre la presencia de BOC_IgG en LCR para definir una puntuación de riesgo, en el que si se identifica una desviación o variación del valor de la puntuación de riesgo, en comparación con un valor de referencia, esto es indicativo de que el paciente padece EM.
6. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra biológica es un líquido biológico seleccionado de sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, orina o lágrimas.
7. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la determinación del nivel de concentración de sIFNAR2 se lleva a cabo mediante un inmunoensayo, preferiblemente mediante una técnica seleccionada de: inmunotransferencia, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, mapa x, microchips de proteínas o ELISA basado en aptámeros, o cualquier técnica para la determinación del nivel de concentración de sIFNAR2 en una muestra biológica.
8. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además:
 - a. recibir mediante un programa informático el nivel de concentración de sIFNAR2, la información sobre la presencia de IRM_DS y/o IRM_DT, los valores de PEV y la información sobre la presencia de BOC_IgG en LCR,
 - b. procesar la información recibida según la etapa a) para encontrar variaciones o desviaciones sustanciales con respecto a la información obtenida de un sujeto sano, y
 - c. proporcionar una salida a través de un elemento de visualización de terminal cuando se encuentra una variación o desviación que indique que el sujeto podría padecer EM.
9. Uso *in vitro* de sIFNAR2 en una muestra biológica obtenida del sujeto, en combinación con las variables IRM_DS y/o IRM_DT medidas por IRM, para el diagnóstico y/o pronóstico de la EM.
10. Uso *in vitro*, según la reivindicación 9, de sIFNAR2 en combinación con las variables IRM_DS y/o IRM_DT medidas por IRM; y en combinación con los valores de PEV.
11. Uso *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, de sIFNAR2 en combinación con las variables IRM_DS y/o IRM_DT medidas por IRM, los valores de PEV y BOC_IgG en LCR.

Figura 1

A) [IFNAR2]

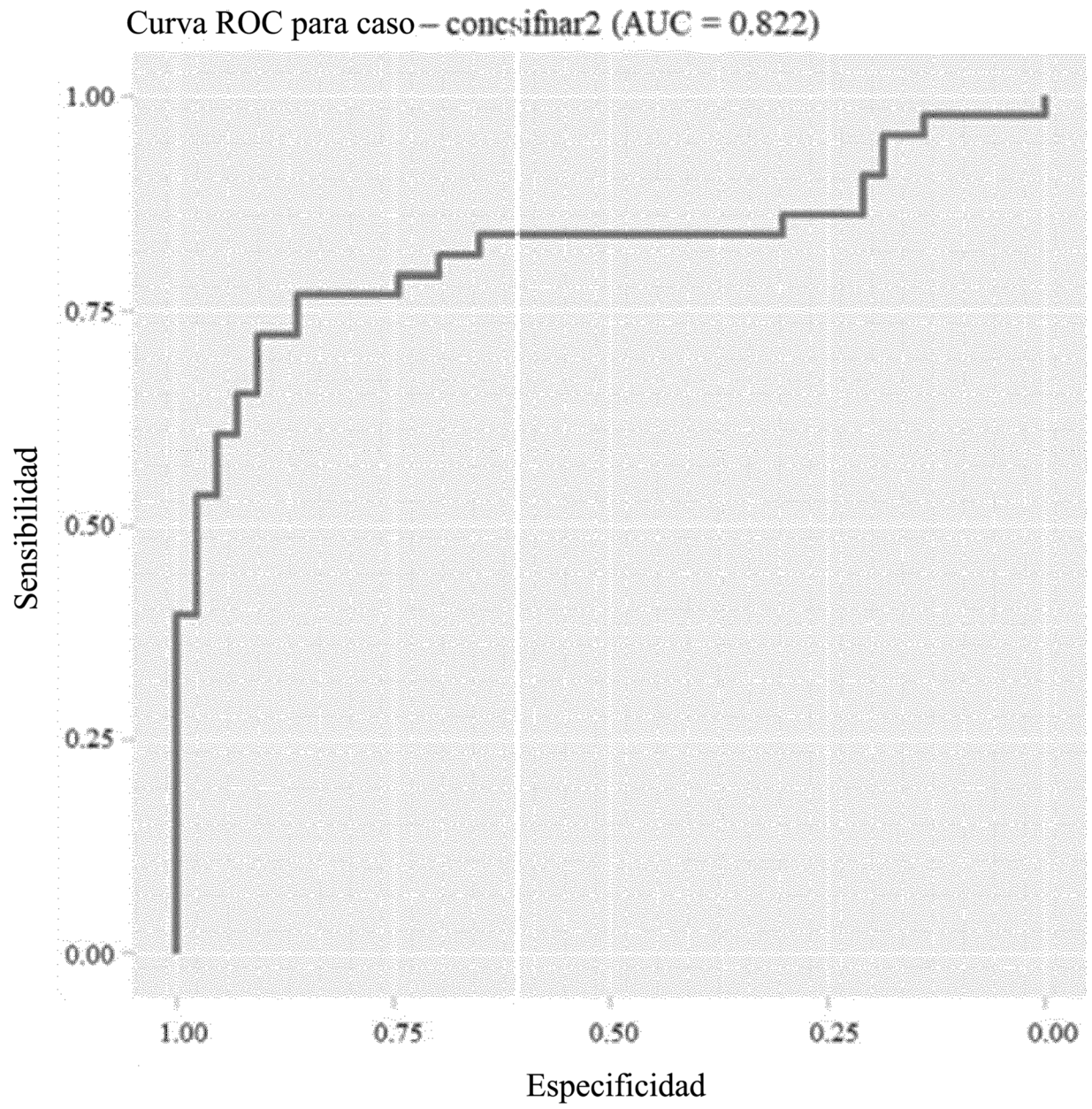


Figura 1 (cont.)

B) [IFNAR2+IRM_DS]

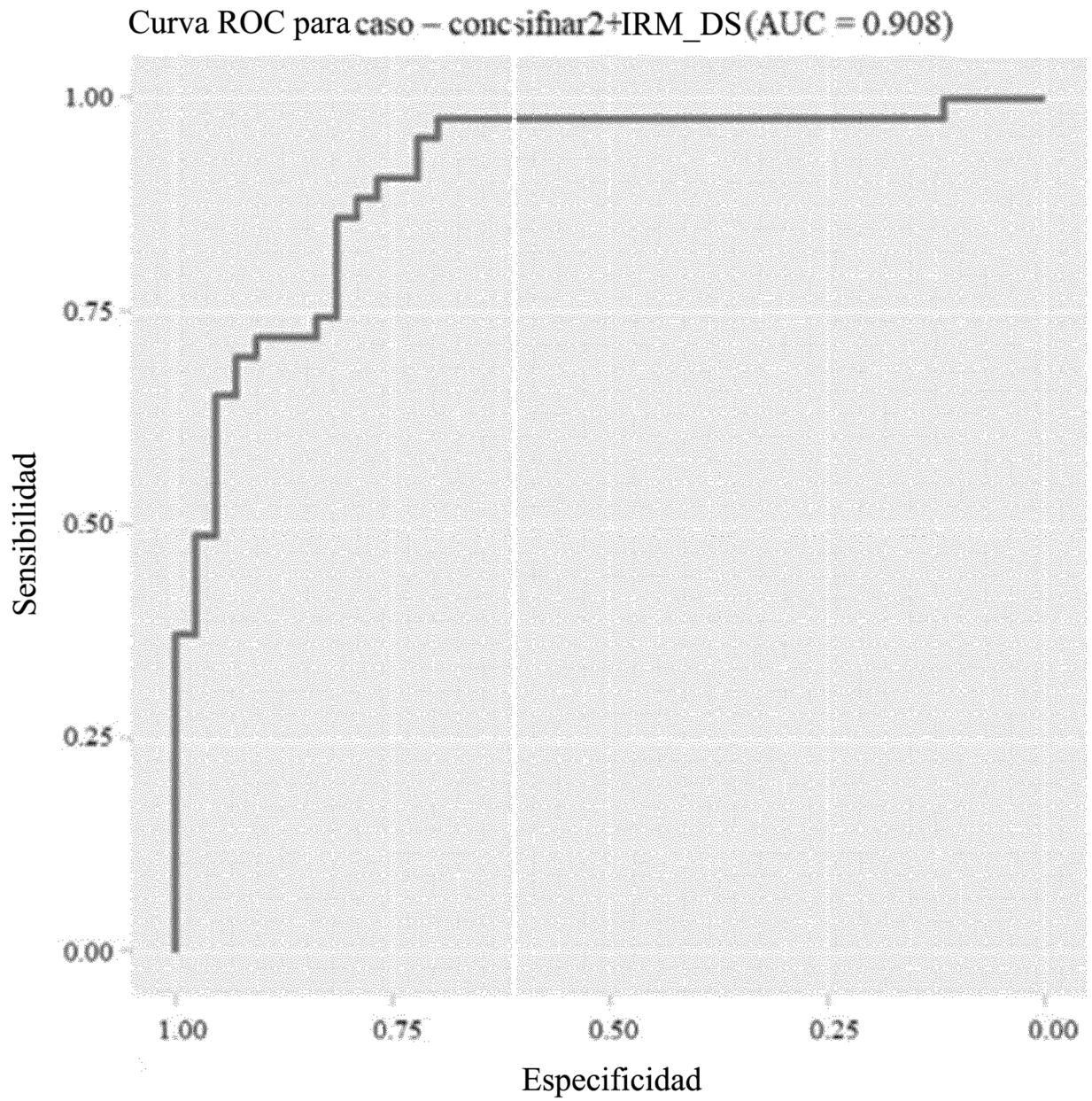


Figura 1 (cont.)

C) [IFNAR2+IRM_DS+PEV]

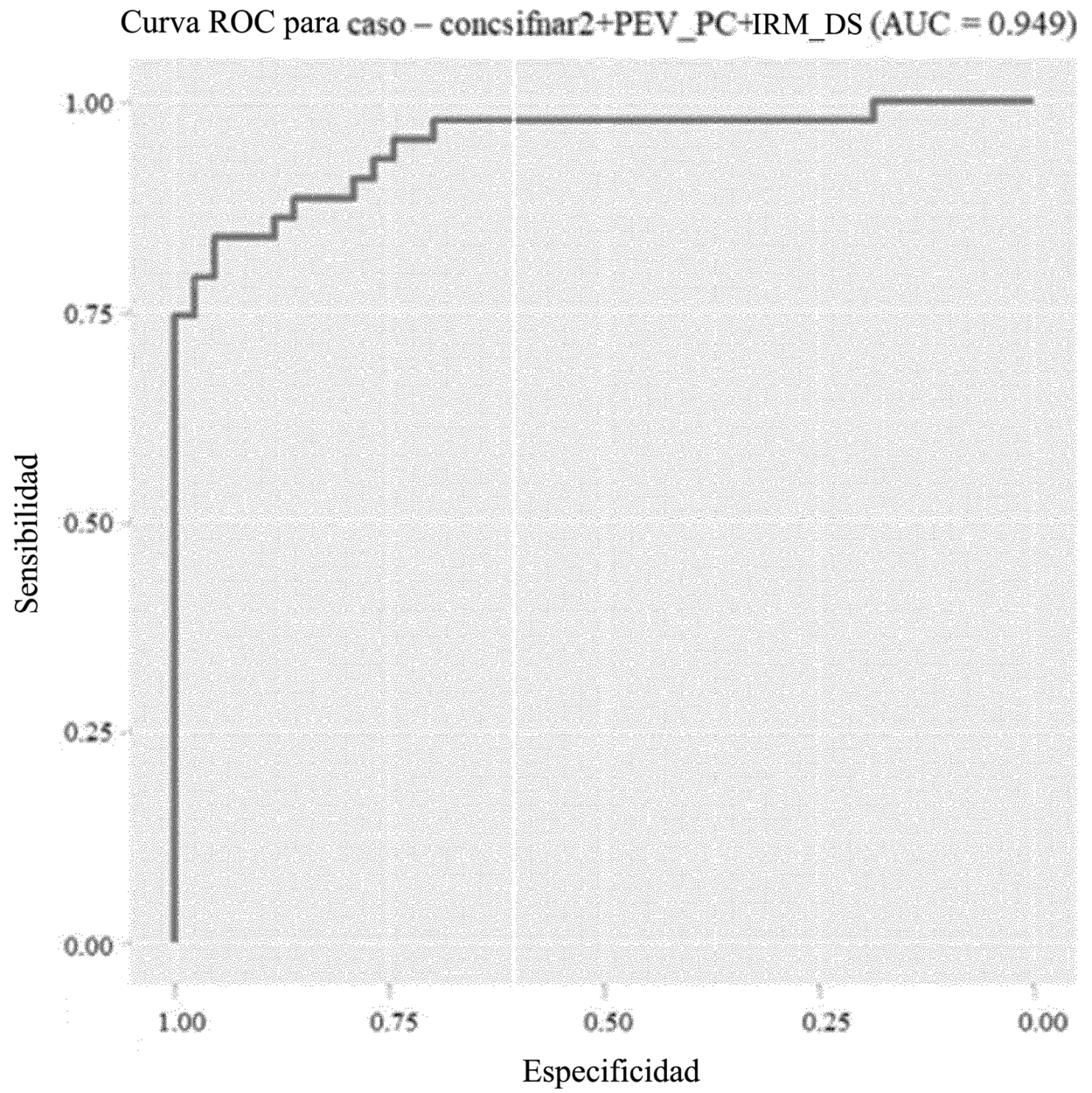


Figura 1 (cont.)

D)[IFNAR2+IRM_DS+IRM_DT_PEV]

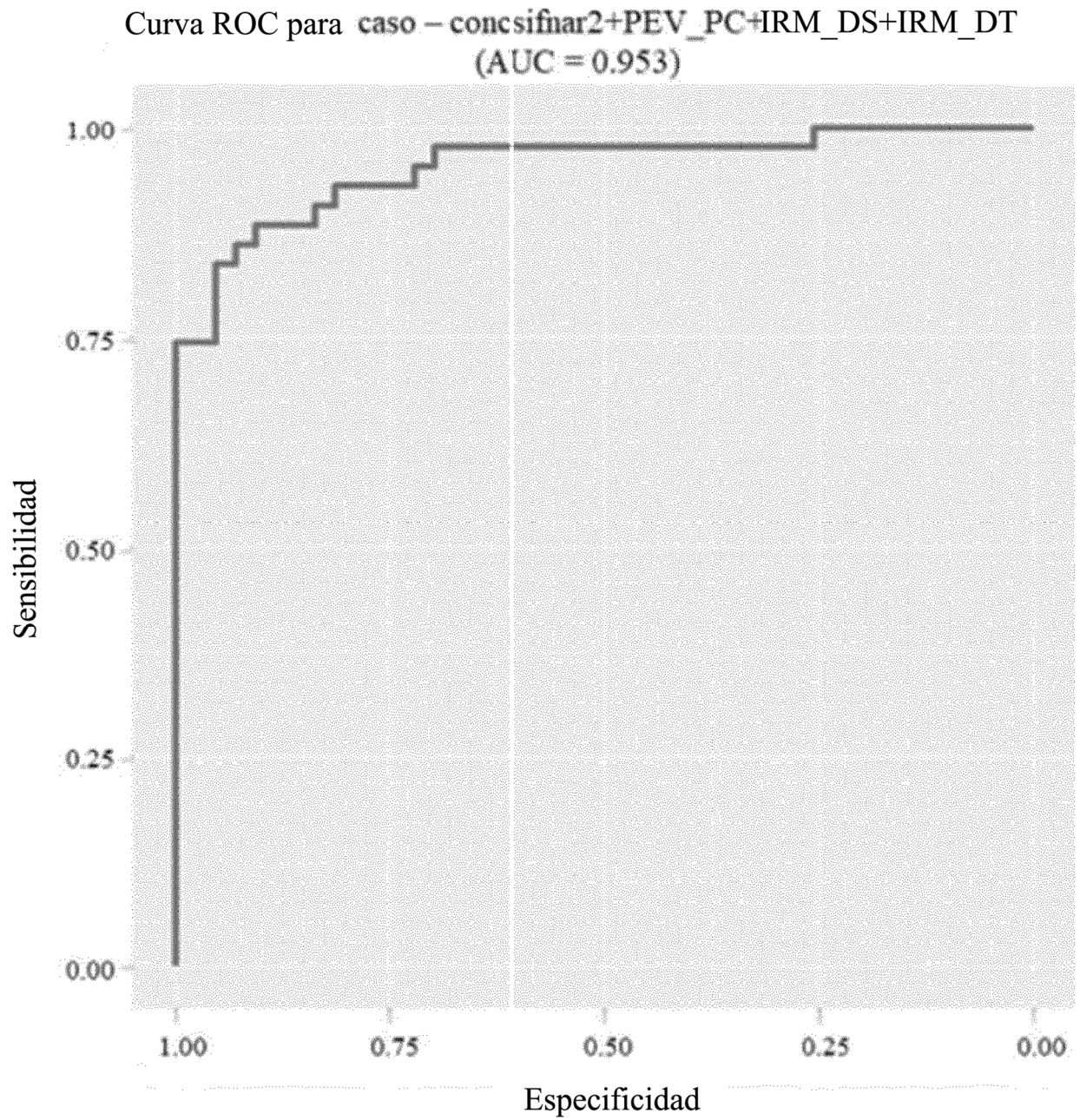


Figura 1 (cont.)

E)[IFNAR2+IRM_DS+PEV+BOC]

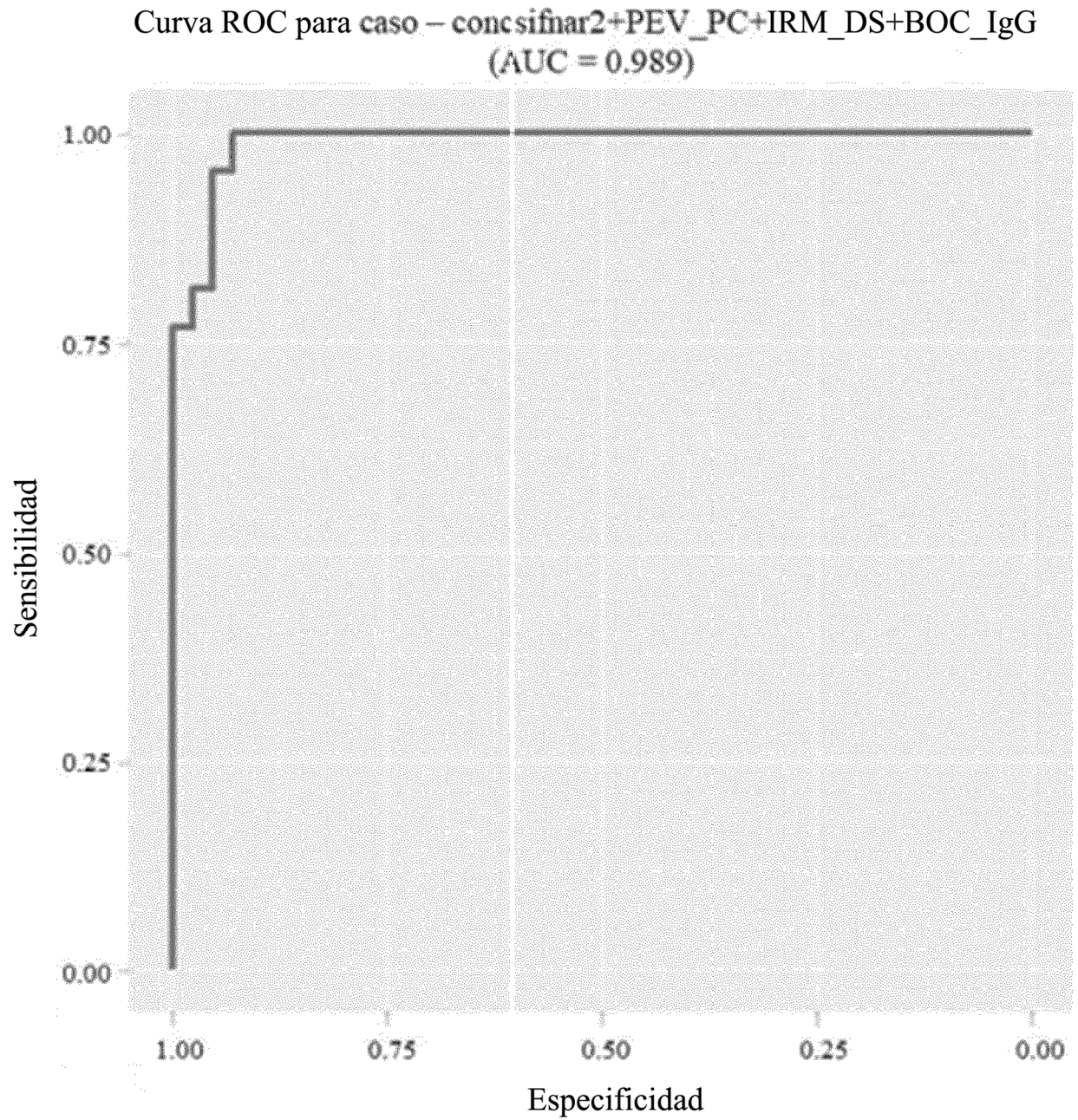


Figura 1 (cont.)

F) [IFNAR2+IRM_DS+IRM_DT_PEV+BOC]

Curva ROC para caso – concsifnar2+PEV_PC+IRM_DS+IRM_DT+BOC_IgG
(AUC = 0.99)

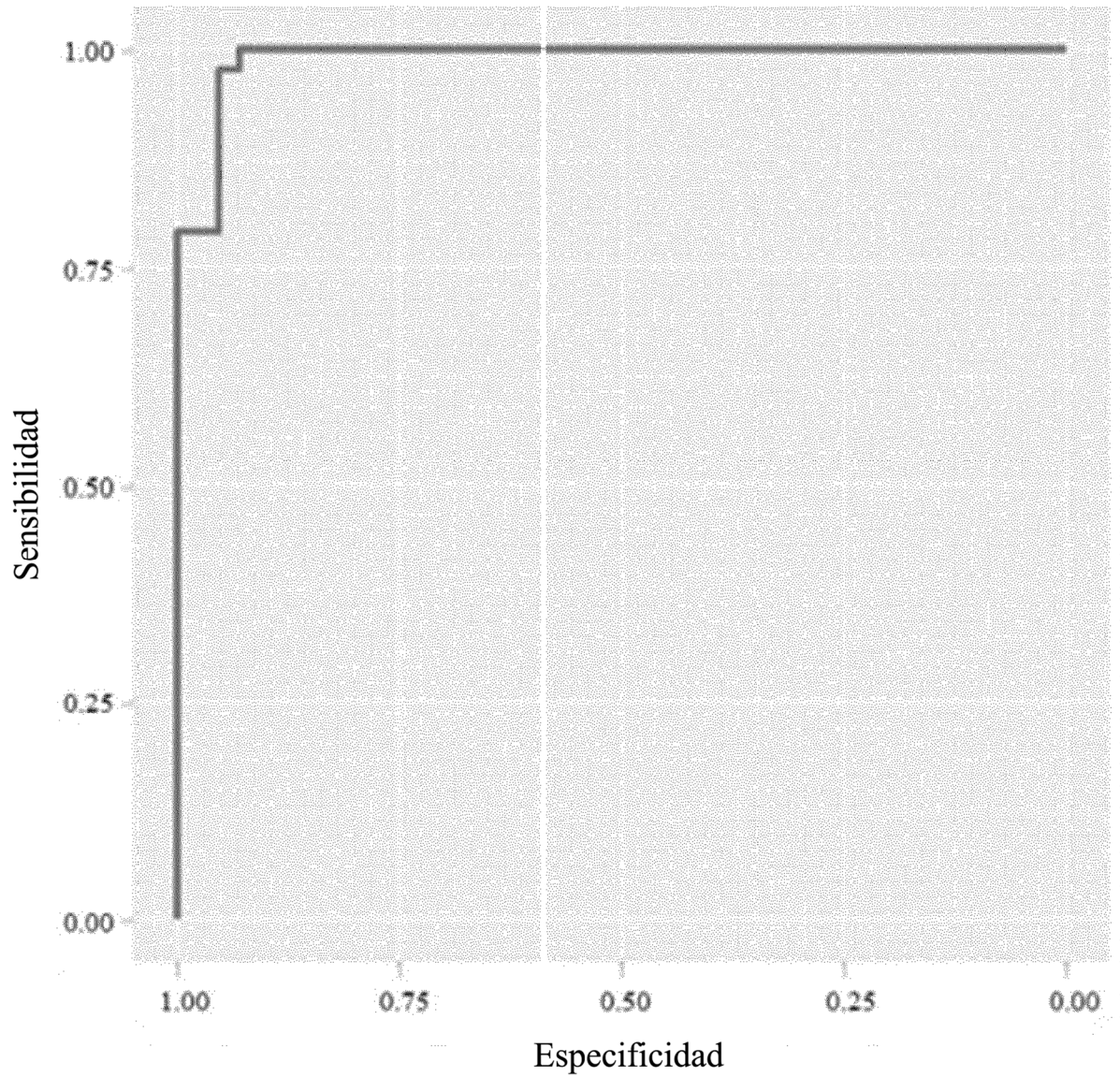


Figura 1 (cont.)

G) [IFNAR2+PEY]

