

(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 2011/135133 A1

(43) Fecha de publicación internacional
3 de noviembre de 2011 (03.11.2011)

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C12N 9/00 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01) G01N 33/564 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2011/070287

(22) Fecha de presentación internacional:

20 de abril de 2011 (20.04.2011)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201030630 28 de abril de 2010 (28.04.2010) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US):

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES]; Avenida María Luisa, s/n, Palacio-Pabellón de Perú, E-41013 Sevilla (ES). **FUNDACIÓN FIBAO, FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOSANITARIA DE ANDALUCÍA ORIENTAL-ALEJANDRO OTERO** [ES/ES]; Avenida Fuerzas Armadas, 2, E-18014 Granada (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):

MATESANZ DEL BARRIO, Fuencisla [ES/ES]; Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, Avenida del Conocimiento, s/n, E-18100 Armilla (Granada) (ES). **FEDETZ, María** [UA/ES]; Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, Avenida del Conocimiento, s/n, E-18100 Armilla (Granada) (ES). **NDAGIRE, Dorothy** [UG/ES]; Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, Avenida del Conocimiento, s/n, E-18100 Armilla (Granada) (ES). **ALCINA MADUEÑO, Antonio** [ES/ES]; Instituto de Parasitología

y Biomedicina López Neyra, Avenida del Conocimiento, s/n, E-18100 Armilla (Granada) (ES). **SABIO, Mario** [ES/ES]; Hospital Virgen de las Nieves, Avenida de las Fuerzas Armadas, 2, E-18014 Granada (ES).

(74) Mandatario: **UNGRIA LÓPEZ, Javier**; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 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, RS, 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: LONG CHAIN ACYL COENZYME-A SYNTHETASES (ACSLs) AS CYTO-SEROLOGICAL BIOMARKERS IN INFLAMMATORY OR AUTOIMMUNE DISEASES

(54) Título : ACIL COENZIMA-A SINTETASAS DE CADENA LARGA (ACSLs) COMO BIOMARCADORES CITO-SEROLÓGICOS EN ENFERMEDADES INFLAMATORIAS O AUTOINMUNES

(57) Abstract: Use of the long chain acyl coenzyme-A synthetases (ACSLs) as cyto-serological biomarkers of inflammatory or autoimmune diseases, in particular of systemic lupus erythematosus, and method for the obtainment of data useful for the diagnosis and monitoring of said diseases.

(57) Resumen: Uso de las Acil-Coenzima-A sintetasas de cadena larga (ACSL) como biomarcadores cito-serológicos de enfermedades inflamatorias o autoinmunes, y especialmente de lupus eritematoso sistémico, y método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y seguimiento de dichas enfermedades.



WO 2011/135133 A1

Acil Coenzima-A sintetetasas de cadena larga (ACSLs) como biomarcadores cito-serológicos en enfermedades inflamatorias o autoinmunes

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología molecular y la medicina, y se refiere al uso de las Acil-Coenzima-A sintetetasas de cadena larga (ACSL) como biomarcadores cito-serológicos de enfermedades inflamatorias o autoinmunes, y especialmente de lupus eritematoso sistémico.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Las Acil-Coenzima A sintetetasas de cadena larga (ACSLs), son enzimas intracelulares constituidas por las isoenzimas ACSL1, ACSL2 (ahora denominada ACSL6) ACSL3, ACSL4 y ACSL5. Activan los ácidos grasos de cadena larga (12 a 22 C) mediante la ligación del Coenzima A (CoA) como primera etapa esencial para su posterior utilización en la síntesis de lípidos y en su degradación así como en la obtención de energía mediante bata-oxidación, regulación y señalización (Bu *et al.*, 2009. *J Biol Chem.* 2009 Sep 8) (Digel *et al.*, 2008. *Mol Cell Biochem.* 2009 Jun;326(1-2):23-8) (Soupene & Kuypers 2008. *Exp Biol Med* (Maywood). May;233(5):507-21) (Webster *et al.*, 2008. *Endocrinology.* Jul;149(7):3679-87) (Watkins *et al.*, 2007. *J Lipid Res.* 2007 Dec;48(12):2736-50) (Cano *et al.*, 2006. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006 Jun;99(4-5):197-202) (Yeh *et al.*, 2006. *Cancer Lett.* Feb 28;233(2):297-308).

El metabolismo de los lípidos y de los ácidos grasos de cadena larga y las acil-CoA sintetetasas se están vinculando a diversas enfermedades y procesos fisiológicos importantes en patogénesis, entre ellas cáncer (Mashima *et al.*, 2009. *Cancer Sci.* 100(8):1556-62) (Celis *et al.*, 2009. *Mol Oncol.* Feb 3) (Tomoda 1991. *Arch Exp Med.* Apr;65 Suppl:1-12), apoptosis (Gassler *et al.*, 2007. *Gastroenterology.* 2007 Aug;133(2):587-98) (Heimli *et al.*, 2003. *Lipids.* Mar;38(3):263-8), inflamación (Westerbacka 2007) (Ciapaite *et al.*, 2006. *Biochim Biophys Acta.* Feb;1771(2):147-54), enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis (Brown *et al.*, 2007. *Curr Atheroscler Rep.* Dec;9(6):494-500), obesidad

(Teng *et al.*, 2009. *FASEB J.* Jun;23(6):1705-9) (Lobo *et al.*, 2009. *J Biol Chem.* 2009 Jul 3;284(27):18347-56), diabetes (Wendel *et al.*, Diabetes. 2010 Mar 3. PubMed electronic pub in advance) (Gu *et al.*, 2009. *PLoS One.* Jun 2;4(6):e5767), enfermedades del sistema nervioso central (SNC) (McGuinness & Smith. 1999. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 1999;47(5):281-7.) (Song *et al.*, 2007. *J Neurosci Res.* Dec;85(16):3586-97) (Mirnics K 2006.)(Rapoport, 2008) (Lee *et al.*, 2007. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* Nov-Dec;77(5-6):239-46. Epub 2007 Nov 26. Review), enfermedad celiaca (Gassler *et al.*, 2007. *Gastroenterology.* Aug;133(2):587-98. Epub 2007 Jun 8) (Obermuller *et al.*, 2006. *Int J Colorectal Dis.* Mar;21(2):130-4. Epub 2005 Apr 5), fallo ovárico prematuro (Kang *et al.*, 2008. Epub 2008 Jun 13). Las ACSLs también han sido recientemente implicadas en arteriosclerosis (Askari *et al.*, 2007. *Diabetes.* Apr;56(4):1143-52. Epub 2007 Jan 26) y complicaciones cardiovasculares (Matsuda *et al.*, 2008. *J Antibiot (Tokyo).* May;61(5):318-21), lo cual es interesante porque conecta con LES ya que estas complicaciones son altamente frecuentes en LES. Por lo cual, las proteínas implicadas en la captación de ácidos grasos y su metabolismo pueden ser importantes dianas farmacéuticas.

20

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune sistémica que la sufren principalmente mujeres jóvenes y tiene el potencial de afectar clínicamente a todos los sistemas de órganos (D'Cruz *et al.* 2007. *Lancet* 369(9561):587-96). Estos incluyen típicamente un sarpullido eritematoso facial con una distribución de tipo "mariposa" encima de la nariz y las mejillas (erupciones cutáneas). La artritis y la artralgia que normalmente afectan a la mayoría las articulaciones falangianas y carpianas se observan en una mayoría de pacientes de LES (dolor de articulaciones). Asimismo, se observa una complicación renal en aproximadamente el 70% de pacientes de SLE, y se considera una de las principales causas de mortandad del LSE. La glomerulonefritis secundaria a la deposición del complejo antígeno-autoanticuerpo en el riñón a menudo lleva al deterioro renal, como se observa por la proteinuria, o en última instancia al fracaso renal. Las presentaciones clínicas normalmente incluyen hematuria o proteinuria asintomáticas, síndromes nefríticos o nefríticos agudos, glomerulonefritis progresiva rápida e insuficiencia renal

35

- crónica. También se observan manifestaciones clínicas del LES en los sistemas linfático, pulmonar, gastrointestinal, hémico, cardiovascular y nervioso central (SNC) (Jain & Halusca 2009. *J Clin Pathol.* 2009 Jul;62(7):584-92) (Guillevin 2009. *Rheumatology (Oxford).* 48 Suppl 3:iii54-7) (Greenberg 2009. *Neurologist* 15(3):115-21) (Buyon *et al.*, 2009. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 5(3):139-48) (Seshan *et al.*, 2009. *Arch Pathol Lab Med.* 133(2):233-48) (Ryan 2009. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 296(4):R1258-67).
- 10 El tratamiento actual del LES depende de la localización y la gravedad de la enfermedad, estando el método de tratamiento a menudo dictado por el sistema de órganos afectado (Tuthill and Khamashta 2009. *J Autoimmun.* Sep;33(2):92-8. Epub 2009 Jun 25. Review). Las artritis o las artralgiás pueden controlarse a menudo con aspirina u otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos. Las manifestaciones más graves del LES, tales como la anemia hemolítica, la púrpura trombocitopénica y lapoliserositis grave se han tratado con prednisona. El tratamiento actualmente recomendado para el deterioro renal utiliza combinaciones de prednisona con agentes inmunosupresores tales como la azatioprina o la ciclofosfamida. Muy buenos resultados se están obteniendo con tratamientos biológicos dirigidos contra las células B (Levesque 2009. *Clin Exp Immunol.* Aug;157(2):198-208. Review; D'Cruz *et al.*, 2007. *Lancet.* 2007 Feb 17;369(9561):587-96. Review).
- 25 Los tratamientos actuales han abordado el lupus nefrítico, aunque los regímenes terapéuticos usados habitualmente son potencialmente tóxicos y pueden ser ineficaces en algunos pacientes de alto riesgo. Normalmente se prescriben regímenes inmunosupresivos intensivos. Para el LES severo, se usan inmunosupresivos tales como quimioterapias y ciclosporina. Otros tratamientos incluyen el tratamiento con corticosteroides y con fármacos citotóxicos. Las terapias alternativas incluyen el tratamiento con ciclofosfamida y con prednisona. Los efectos secundarios del uso a largo plazo de prednisona incluyen el desarrollo de presión sanguínea elevada, de diabetes y de osteoporosis. Actualmente, varias compañías farmacéuticas están aplicando terapias biológicas como terapia anticitocinas, como bloqueadores del TNF- α , bloqueadores de IL1, IL6 e IL10; también muy importante es la terapia dirigida contra los

linfocitos B como anticuerpos anti-CD20 (Rituximab, ocrelizumab) (D'Cruz *et al.*, 2007. *Lancet* 369(9561):587-96).

5 El pronóstico de los pacientes con LES ha mejorado en las últimas cuatro décadas, paralelo a los más importantes avances en el diagnóstico y tratamiento, así como a nuestro entendimiento del proceso fisiopatológico y su expresión clínica. No existe una prueba inequívoca para el diagnóstico del lupus, con lo que se basa en la clínica y en los hallazgos analíticos (Yee *et al.*, 2009. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 23(4):457-10 67).

La presencia de compromiso visceral-orgánico principal como el SNC y más consistentemente enfermedad renal se ha asociado con mal pronóstico. Adicionalmente, hay un mayor riesgo de progresión a 15 enfermedad renal terminal cuando en la patología se encuentran lesiones vasculares. La trombocitopenia implica mal pronóstico en varios estudios, en especial cuando es una manifestación aguda. La hipertensión ha sido identificada como un factor de riesgo para mortalidad en LES, aunque puede ser parte de manifestaciones tardías no relacionadas con actividad 20 de la enfermedad. Síndrome metabólico y arteriosclerosis se incrementan especialmente en LES (Sabio *et al.*, 2009. *J Rheumatol* 36(10):2204-11).

Los criterios de la ACR (American College of Rheumatology) tienen una 25 sensibilidad de 96% y especificidad de 96%. La actividad global al inicio de la enfermedad como predictor de mortalidad, es un factor recientemente estudiado con el advenimiento de los diferentes índices (SLEDAI, LAI, SLAM, BILAG) y daño orgánico SLICC/ACR Damage Index (SDI) validados para medir de manera reproducible y confiable el grado de actividad de la enfermedad. Varios estudios han documentado el grado 30 de actividad medido por SLEDAI (*Sistemic Lupus Erythematosous Diseases Activity Index*) como índice de actividad y factor de mal pronóstico para mortalidad al presentarse con el inicio de la enfermedad en una clínica de Lupus o al momento de la biopsia renal inicial.

35 Normalmente, los pacientes de LES presentan niveles elevados en suero de autoanticuerpos contra constituyentes nucleares. La elevación del anticuerpo antinuclear (ANA) a títulos de 1:40 o superiores es el criterio

diagnostico más sensible. Más del 99% de pacientes con lupus tienen una elevación de ANA. Aunque una proporción significativa de pacientes puede tener ANA negativos al inicio de la enfermedad. Los principales antígenos de los anticuerpos producidos en pacientes con LES incluyen complejos proteína-ácido nucleico, tales como cromatina, las partículas de ribonucleoproteína nuclear pequeña Sm y U1 (snRNP) y los complejos Ro/SSA y La/SSB RNP es decir, anticuerpos antinucleares, particularmente el ADN bicatenario, y la patología mediada por inmunocomplejos (Yang 2009. *Rheumatology (Oxford)*. 48(9):1083-7). Los anticuerpos antinucleares testados y los anticuerpos antinucleares anti-ENA forman el pilar principal de un estudio serológico para lupus. También se detectan autoanticuerpos de fosfolípidos y de moléculas de la superficie celular. Los anticuerpos antifosfolípidos pueden predisponer a la trombosis. Más específico es el anticuerpo anti-smith. Los complejos autoanticuerpos nucleares con sus antígenos respectivos, que se depositan subsiguientemente en los vasos sanguíneos pequeños, es una causa directa de muchas de las manifestaciones clínicas del LES. Otros estudios rutinarios efectuados en presuntos LES son los niveles del sistema del complemento (niveles bajos sugieren consumo por parte del sistema inmunitario, electrolitos y función renal (trastornada si el riñón está afectado), enzimas del hígado y un recuento completo de la sangre. Se han encontrado evidencias que sugieren que el LES puede tener incidencia en el cáncer de pulmón y cáncer de testículo.

Sin embargo muy pocos biomarcadores en lupus han sido validados y empleados para tomar decisiones clínicas. La falta de biomarcadores fiables, específicos para lupus empeora el adecuado manejo clínico del LES e impide el desarrollo de nuevas terapias para lupus lo cual hace que la búsqueda de biomarcadores que reflejen con precisión la patofisiología y los cambios clínicos. De momento varios marcadores de laboratorio han demostrado promesa para la susceptibilidad al lupus, diagnosis y seguimiento. Estos incluyen ciertos polimorfismos de tipo SNP y de variación de copia (CNV) de los genes del complemento C4 y del receptor Fcγ3 (susceptibilidad a la enfermedad), C4d unido a eritrocitos (Yang 2009 *Rheumatology (Oxford)*. 48(9):1083-7) el cual está más elevado en LES y específicamente en lupus con anemia hemolítica. No correlaciona con el SLEDAI ni con otros marcadores de actividad de la enfermedad

como anti-dsDNA, C3 y C4. Por lo tanto tiene un valor limitado. Células plasmáticas CD27 (high) (actividad de la enfermedad), firma de interferón (actividad de la enfermedad) y anti-C1q y anti-NMDA (actividad de la enfermedad e implicación de órgano –SNC-). Todos estos biomarcadores tienen que ser todavía validados en estudios rigurosos y a gran escala en poblaciones diferentes (Liu & Ahearn 2009. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 23(4):507-23).

Para diagnosticar lupus nefritis se requiere actualmente una biopsia. Sin embargo es una técnica invasiva no recomendable con la clínica diaria. Se necesitaría un biomarcador que esté implicado en la patogénesis de LN. Hay candidatos que no están de momento totalmente consolidados: CCL2 (chemokine ligand 2; también conocido como MCP-1); CCL5 (chemokine ligand 5; también conocido como RANTES); y CX3CL1 (chemokine ligand 1; también conocido como fractalkine); IP-10 (interferon-inducible protein 10; también conocido como chemokine ligand 10); neutrophil gelatinase associate lipocalin; hepcidin; adiponectin; transferrin; ceruloplasmin; lipocalin-like prostaglandin synthetase-D; y orosomucoid (Das L).

Actualmente han sido validadas varias escalas para medir la actividad del LES, como el SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Activity Index*), BILAG (*British Isles Lupus Assessment Group*), SLAM (*Systemic Lupus Activity Measure*), ECLAM (*European Concensus Lupus Activity Measure*), LAI (*Lupus Activity Index*), que están mostrando una buena correlación entre ellas (Ward *et al.*, 2000. *J. Rheumatol* 27: 664-670). Junto a los diferentes índices (SLEDAI, LAI, SLAM, BILAG) y daño orgánico (SLICC /ACR -*Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index*, Gladman *et al.*, 1996. *Arthritis Rheum.* 39 (3): 363-369). Con el advenimiento de los diferentes índices y el daño orgánico, los predictores de mortalidad son factores recientemente estudiados.

Es necesario, por tanto, encontrar un método alternativo de diagnóstico, menos invasivo, que permita el diagnóstico de enfermedades inflamatorias o autoinmunes complejas, es decir, que son causadas por numerosos factores, y preferiblemente, que permitan el diagnóstico del

lupus eritematoso sistémico (LES), y la subclasificación de los individuos afectados por dicha enfermedad en función de sus manifestaciones clínicas y predictores de mortalidad.

5 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de enfermedades inflamatorias o autoinmunes, y entre ellas del lupus eritematoso sistémico (LES), permitiendo además la pronta identificación de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas de lupus y el establecimiento de grupos de pacientes en combinación con dichas manifestaciones clínicas, así como la evaluación de la respuesta al tratamiento de dichas enfermedades.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de de los genes de la familia de las Acil-Coenzima A sintetetasas de cadena larga (ACSLs) o sus productos de expresión, como marcadores para el diagnóstico, pronóstico, o seguimiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes. En una realización preferida, la enfermedad inflamatoria o autoinmune se selecciona de la lista que comprende: Lupus eritematoso sistémico (LES), Artritis reumatoide (AR), Arteriosclerosis (AS), Hipertensión (HT), Diabetes no insulina dependiente tipo 2 (T2D), Síndrome metabólico (incluye varias de las mencionadas), enfermedad de Crohn, o cualquiera de sus combinaciones. En otra realización más preferida, la enfermedad inflamatoria o autoinmune es el lupus eritematoso sistémico (LES).

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes, de ahora en adelante método de la invención, que comprende:

- a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y
- b) cuantificar el producto de expresión de, al menos, uno de los genes de la familia de las Acil-Coenzima A sintetetasas de cadena larga (ACSLs) en la muestra biológica aislada de (a).

En una realización preferida, el método de la invención además comprende:

c) comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia.

5

La cantidad de referencia se obtiene a partir de los valores de expresión constitutiva del gen, en un grupo de pacientes sanos. Los pasos (b) y/o (c) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o 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).

10

En otra realización preferida de este aspecto de la invención la muestra biológica aislada de un individuo del paso (a) comprende células de sangre periférica (*peripheral blood mononuclear cells* PBMCs).

15

En esta memoria se entiende por célula mononuclear de sangre periférica (PBMC) una célula sanguínea caracterizada por poseer un único núcleo redondo, como los linfocitos, los monocitos o los macrófagos. Estas células sanguíneas son un componente crítico en el sistema inmune, concretamente para combatir las infecciones. La población de linfocitos está formada por células T (CD4 y CD8 positivas ≈75%)

20

Estas células se obtienen a menudo de la sangre usando ficol, un polisacárido hidrofílico que separa capas de la sangre, con monocitos y linfocitos formando un *buffy coat* bajo la capa del plasma. Este *buffy* contiene las PBMCs. Existen otros métodos de extracción conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo, extraerlas a partir de la sangre total con una solución de lisis hipotónica que preferiblemente lisa las células rojas sanguíneas. Este método da lugar a neutrófilos y otras células polimorfonucleares (PMN) importantes en la defensa inmune innata.

25

30

En otra realización preferida de este aspecto de la invención los genes de la familia de las *ACSLs* se seleccionan de la lista que comprende: *ACSL1*, *ACSL6* (*ACSL2*), *ACSL3*, *ACSL4*, *ACSL5*, o cualquiera de sus combinaciones.

35

En otra realización preferida, la enfermedad inflamatoria o autoinmune se selecciona de la lista que comprende: lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR), arteriosclerosis (AS), hipertensión (HT), diabetes no insulina dependiente tipo 2 (T2D), síndrome metabólico (incluye varias de las mencionadas), enfermedad de Crohn, o cualquiera de sus combinaciones. En otra realización aún más preferida, la enfermedad inflamatoria o autoinmune es el lupus eritematoso sistémico (LES).

El término “diagnóstico”, tal y como se utiliza en la presente invención, a la capacidad de discriminar entre individuos afectados o no por una enfermedad inflamatoria o autoinmune. Preferiblemente la enfermedad inflamatoria o autoinmune es la artritis reumatoide (AR), la arteriosclerosis (AS), la hipertensión (HT), la diabetes no insulina dependiente tipo 2 (T2D), el síndrome metabólico, la enfermedad de Crohn, o cualquiera de sus combinaciones. Aún más preferiblemente, es el lupus eritematoso sistémico (LES). También se refiere, pero sin limitarnos, a la capacidad de discriminar entre muestras procedentes de pacientes que presentan diferentes estados de lupus eritematoso sistémico (LES). A su vez, atendiendo al método de la presente invención, se podrían establecer otras subclasificaciones dentro de esta principal, facilitando, por tanto, la elección y el establecimiento de regímenes terapéuticos adecuados. Esta discriminación 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 estadísticamente significativa 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 significación P, test de Student o funciones discriminantes de Fisher, medidas no paramétricas de Mann Whitney, correlación de Spearman, regresión logística, regresión lineal, área bajo la curva de ROC (AUC). 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 de forma diferencial 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.

Una "muestra biológica aislada" incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Preferiblemente, la muestra biológica aislada comprende células mononucleares de sangre periférica (*peripheral blood mononuclear cells* PBMCs).

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 éste de cualquier edad, sexo y condición física.

ACSL1 (*acyl-CoA synthetase long-chain family member 1*), es una isoenzima de la familia de las Acil-Coenzima A sintetasas de cadena larga. Aunque difieren en la especificidad de su sustrato, localización subcelular, y distribución tisular, todas las isoenzimas de esta familia convierten los ácidos grasos de cadena larga en Acil-CoA ésteres de ácidos grasos, y, por tanto, juegan un papel clave en la biosíntesis de los lípidos de membrana y en la degradación de los ácidos grasos por beta-oxidación. También se denomina *fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 1; fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 2; lignoceroyl-CoA synthase; long-chain acyl-CoA synthetase 1; long-chain acyl-CoA synthetase 2; long-chain fatty-acid-coenzyme A ligase 1; palmitoyl-CoA ligase 2; paltimoyl-CoA ligase 1*. Se localiza en el cromosoma 4 (4q34-q35). Otras abreviaturas son: ACS1; LACS; FAcl1; FAcl2; LACS1; LACS2. Su secuencia aminoacídica se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP_001986.2; y/o en la SEQ ID NO: 1.

En el contexto de la presente invención, *ACSL1* se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 1, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria

hibrida en condiciones astringentes con la secuencia polinucleotídica de (a),

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

5 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 1, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína ACSL1.

10

ACSL6 (ACSL2) (*acyl-CoA synthetase long-chain family member 6/* (EC 6.2.1.3)), es una isoenzima de la familia de las Acil-Coenzima A sintetasas de cadena larga que se denomina también *fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 6; long fatty acyl-CoA synthetase 2; long-chain acyl-CoA synthetase 6*. Se localiza en el cromosoma 5 (5q31). Otras abreviaturas son: *ACS2; FAFL6; LACS2; LACS5; FLJ16173; KIAA0837*. Su secuencia aminoacídica se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP_056071.2; NP_001009185.1 y/o en la SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3, isoforma a/isoforma b, entre otros con homología
15
20 indicada.

En el contexto de la presente invención, *ACSL6* 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 o la SEQ ID NO: 3,
25 y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria
30 hibrida en condiciones astringentes con la secuencia polinucleotídica de (a),

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

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que
35 comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos

nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína ACSL6.

5 ACSL3 (*acyl-CoA synthetase long-chain family member 3*), es otra isoenzima de la familia de las Acil-Coenzima A sintetasas de cadena larga que también se denomina *fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 3; lignoceroyl-CoA synthase*. Se localiza en el cromosoma 2 (2q34-q35). Otras abreviaturas son: ACS3, FACL3, PRO2194. Se expresa de manera notable en el cerebro y preferiblemente utiliza miristato, araquidonato, y
10 eicosapentaenoato como sustratos. La secuencia de aminoácidos de esta isoenzima es un 92% idéntica a la de su homólogo en rata. Se han encontrado dos transcritos que codifican este gen. Su secuencia aminoacídica se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP_004448.2 y/o en la SEQ ID NO: 4.

15 En el contexto de la presente invención, ACSL3 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 4, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

20 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 4,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida en condiciones astringentes con la secuencia polinucleotídica de (a),

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

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 4, y en las
30 que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína ACSL3.

ACSL4 (*acyl-CoA synthetase long-chain family member 4*), es otra isoenzima de la familia de las Acil-Coenzima A sintetasas de cadena larga
35 que también se denomina: *acyl-CoA synthetase 4; fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 4; lignoceroyl-CoA synthase; long-chain fatty-acid-Coenzyme A ligase 4*. Se localiza en el cromosoma X (Xq22.3-q23). Otras

abreviaturas son: *ACS4*, *FACL4*, *LACS4*, *MRX63*, *MRX68*. Esta enzima emplea como sustrato araquidonato, preferiblemente. La ausencia de este enzima puede contribuir al retardo mental o síndrome de Alport. El splicing alternativo de este gen genera 2 transcritos. Su secuencia aminoacídica se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP_004449.1; NP_0765266.1 y/o en la SEQ ID NO: 5 (isoforma 1), SEQ ID NO: 6 (isoforma 2).

En el contexto de la presente invención, *ACSL4* se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida en condiciones astringentes con la secuencia polinucleotídica de (a),

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

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína *ACSL4*.

ACSL5 (*acyl-CoA synthetase long-chain family member 5*), es otra isoenzima de la familia de las Acil-Coenzima A sintetasas de cadena larga que también se denomina: *FACL5* por *fatty acid coenzyme A ligase 5*; *fatty acid coenzyme A ligase 5*; *fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 5*; *long-chain acyl-CoA synthetase 5*; *long-chain fatty acid coenzyme A ligase 5*. Se localiza en el cromosoma 10 (10q25.1-q25.2). Otras abreviaturas son: *RP11-324O2.5*, *ACS2*, *ACS5*, *FACL5*. Esta isoenzima se expresa abundantemente en el útero y en el bazo, y en cantidades traza en el cerebro normal, pero presenta niveles elevados en gliomas malignos. Este gen interviene en el crecimiento celular de los gliomas

mediado por los ácidos grasos. Se han encontrado tres transcritos codificando dos isoformas para este gen. Su secuencia aminoacídica se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP_976313.1; NP_057318.2 y/o en la SEQ ID NO: 7 (isoforma b), SEQ ID NO: 8 (isoforma a).

En el contexto de la presente invención, *ACSL5* se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 7, o la SEQ ID NO: 8, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 7, o la SEQ ID NO: 8,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida en condiciones astringentes con la secuencia polinucleotídica de (a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de (a) o (b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 7, o la SEQ ID NO: 8, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína *ACSL5*.

La detección de la cantidad del producto de expresión de los genes seleccionados de la lista que comprende: *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5*, o cualquiera de sus combinaciones, puede realizarse por cualquier medio conocido en el estado de la técnica. Los autores de la presente invención han demostrado que la detección de la cantidad o la concentración de estos productos de expresión de manera semi-cuantitativa o cuantitativa permiten diferenciar entre los diferentes estadios del LES. De esta manera, se puede establecer un diagnóstico diferencial en individuos afectados por LES, que permite subclasificarlos.

La medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa, puede ser llevada 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 de los genes, basada en una señal que se obtiene directamente de los transcritos de dichos genes, o de las proteínas (enzimas ACSL), y que está correlacionada directamente con el número de moléculas de RNA o de proteínas producidas por los genes. Dicha señal – a la que también podemos referirnos como 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 biológica (por ejemplo la medida de respuestas 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 productos de expresión de los genes, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con los mismos o que pueda derivarse de éstos. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de dichos productos de expresión obtenidos mediante medida directa. 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 productos de expresión de los genes *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5* de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una cantidad de los productos de expresión de los genes *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5* de una o varias muestras 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) del método 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 (al gen de referencia) de productos de expresión de los genes *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5* que permite discriminar un determinado estadio de LES de otros estadios, o de otras enfermedades. Las cantidades de referencia 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. Así, por ejemplo pero sin limitarnos, la muestra de referencia pueden ser los controles negativos, esto es, las cantidades detectadas por el método de la invención en muestras de individuos que no padecen ninguna enfermedad inflamatoria o autoinmune, y más preferiblemente, que no padecen LES.

La cantidad de referencia será, por ejemplo, en el caso de la diferenciación entre los pacientes afectados por la enfermedad inflamatoria de los pacientes sanos, la expresión constitutiva del gen en un grupo control de pacientes sanos. Sin embargo, en el caso de la subclasificación de los pacientes afectados por lupus en función de sus manifestaciones, el grupo control estará formado por un grupo de enfermos con lupus que no tuvieron esa manifestación clínica.

Así pues, la muestra o muestras de referencia pueden ser, por ejemplo, obtenidas a partir del suero de un paciente con enfermedad inflamatoria o autoinmune, y más preferiblemente con un paciente de LES, en una determinada fase clínica. En otra realización preferida de este aspecto de la presente invención, la cantidad de referencia se obtiene a partir de una muestra de referencia. La cantidad de referencia puede obtenerse también, por ejemplo, de los límites de distribución normal de una cantidad encontrada en muestras obtenidas de una población de pacientes con la enfermedad inflamatoria o autoinmune de interés en distintas fases, mediante técnicas estadísticas bien conocidas. Preferiblemente, la enfermedad inflamatoria o autoinmune de interés es LES.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "variante" se refiere a una proteína sustancialmente homóloga a cualquiera de las proteínas

ACSL1, ACSL2, ACSL3, ACSL4, o ACSL5. 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 metilación o acilación.

Tal como aquí se utiliza, una proteína es "sustancialmente homóloga" a cualquiera de las proteínas ACSL1, ACSL2, ACSL3, ACSL4, o ACSL5, cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, respectivamente a como se ha descrito anteriormente; es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, y SEQ ID NO: 8, 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 cualquiera de las proteínas ACSL1, ACSL2, ACSL3, ACSL4, o ACSL5 pueden ser identificadas fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

La expresión "funcionalmente equivalente", tal como aquí se utiliza, significa que las proteínas o el/los fragmento/s de la/s proteína/s en cuestión mantiene/n esencialmente las propiedades biológicas o inmunológicas descritas en este documento. Dicha capacidad se puede determinar mediante métodos convencionales.

En otra realización preferida, la detección de la cantidad de cualquiera de las proteínas ACSL1, ACSL2, ACSL3, ACSL4, o ACSL5 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 una anticuerpo con un antígeno. 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, x-map o *chips* de proteína.

- 5 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 un inmunorreactivo (antígeno o anticuerpo) puede ser inmovilizado en un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase
10 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.

El término "compuesto marcador", tal y como se utiliza en la presente
15 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 frente a los antígenos ACSL1, ACSL2, ACSL3, ACSL4, y/o ACSL5. El compuesto marcador se selecciona de la lista que comprende radioisótopos,
20 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 ^{32}P o ^{35}S , fluorocromos como fluoresceína o partículas metálicas, para su detección directa mediante colorimetría, auto-radiografía, fluorimetría, o metalografía respectivamente.

30 Otro aspecto de la invención se refiere a un método de diagnóstico de lupus eritematoso sistémico, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a)-(c) según el primer método de la invención, y que además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico
35 cuando presenta una cantidad de producto de expresión de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: *ACSL1*, *ACSL3*, *ACSL5* o cualquiera de sus combinaciones, detectados en el paso (b) menor y

estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia.

5 En otra realización preferida, el segundo método de la invención además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico cuando presenta una cantidad de producto de expresión de los genes *ACSL1A*, *ACSL1SI*, *ACSL2A*, *ACSL2SI*, *ACSL3SI*, *ACSL4SI*, *ACSL5*, o cualquiera de sus combinaciones, detectado en el paso (b) mayor y estadísticamente
10 significativa en comparación con una cantidad de referencia (que se obtiene del grupo control sin lupus).

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el segundo método de la invención además comprende asignar al individuo según el
15 paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico con manifestaciones cutáneas cuando presenta una cantidad de producto de expresión de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: *ACSL1A*, *ACSL1SI*, *ACSL3SI*, o cualquiera de sus combinaciones, detectado en el paso (b) menor y estadísticamente
20 significativa en comparación con una cantidad de referencia.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el segundo método de la invención además comprende asignar al individuo según el
25 paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico con manifestaciones articulares cuando presenta una cantidad de producto de expresión del gen *ACSL4N* detectado en el paso (b) mayor, y (o simultáneamente) una cantidad de producto de expresión del gen *ACSL4SI* menor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia.

30 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el segundo método de la invención además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico con manifestaciones renales cuando presenta una cantidad de
35 producto de expresión del gen *ACSL3SI* detectado en el paso (b) mayor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el segundo método de la invención además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico con manifestaciones hematológicas cuando presenta una cantidad de producto de expresión del gen *ACSL4S1* detectado en el paso (b) mayor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el segundo o el tercer método de la invención además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico con manifestaciones neurológicas cuando presenta una cantidad de producto de expresión del gen *ACSL4A* detectado en el paso (b) menor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia.

Actualmente han sido validadas varias escalas para medir la actividad del LES, como el SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Activity Index*), BILAG (*British Isles Lupus Assessment Group*), SLAM (*Systemic Lupus Activity Measure*), ECLAM (*European Concensus Lupus Activity Measure*), LAI (*Lupus Activity Index*), que están mostrando una buena correlación entre ellas (Ward *et al.*, 2000. *J. Rheumatol* 27: 664-670). Junto a los diferentes índices (SLEDAI, LAI, SLAM, BILAG) y daño orgánico (SLICC /ACR -*Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index*, Gladman *et al.*, 1996. *Arthritis Rheum.* 39 (3): 363-369)

Así pues, a cantidad de referencia puede obtenerse también, por ejemplo, de los límites de distribución normal de una cantidad encontrada en muestras obtenidas de una población de pacientes con una enfermedad inflamatoria o autoinmune, y preferiblemente con LES, en distintas fases o con distintas manifestaciones clínicas, mediante técnicas estadísticas bien conocidas.

Se entiende por "perfil de expresión génica" el perfil génico obtenido tras la cuantificación del ARNm y/o de proteína producida por los genes de interés o biomarcadores, es decir, por los genes *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*,

ACSL4, o *ACSL5*, en una muestra biológica aislada. El perfil de expresión de los genes se realiza, preferiblemente, determinando el nivel de ARNm derivado de su transcripción, previa extracción del ARN total presente en la muestra biológica aislada, lo cual puede realizarse mediante protocolos conocidos en el estado de la técnica. La determinación del nivel de ARNm derivado de la transcripción de los genes *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5*, puede realizarse, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), RT-PCR cuantitativa, retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR), o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos; análisis en serie de la expresión génica (SAGE, SuperSAGE); chips de ADN elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo; *microarrays* de ADN elaborados con oligonucleótidos sintetizados *in situ* mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo; hibridación *in situ* utilizando sondas específicas marcadas con cualquier método de marcaje; mediante geles de electroforesis; mediante transferencia a membrana e hibridación con una sonda específica; mediante resonancia magnética nuclear o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen utilizando nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio. El perfil de expresión génica también podría obtenerse mediante la detección y/o cuantificación de las proteínas producto de la traducción del ARNm derivado de la transcripción de los genes *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5*, mediante por ejemplo, pero sin limitarnos, inmunodetección por *western blot*.

La detección cuantitativa de la expresión de los genes *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5* puede realizarse más preferiblemente mediante PCR en tiempo real (RT-PCR ó RTqPCR). La detección en tiempo real de los productos amplificados puede llevarse a cabo mediante la utilización de moléculas fluorescentes que se intercalan en el ADN de cadena doble o mediante hibridación con diferentes tipos de sondas. Así, en otra realización preferida, la expresión de los genes *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5* se detecta mediante RTqPCR empleando los cebadores SEQ ID NO: 11 - SEQ ID NO: 23, indicados en la Tabla 1.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante kit de la invención, que comprende los elementos necesarios para analizar los productos de expresión de, al menos uno, preferiblemente dos, más preferiblemente tres, más preferiblemente cuatro, y aún más preferiblemente los cinco genes *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5* en la muestra obtenida en el paso (a). Más preferiblemente comprende los medios necesarios para comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

Aún más preferiblemente, el kit de la presente invención comprende los elementos necesarios para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la presente invención.

Dicho kit puede contener todos aquellos reactivos necesarios para analizar la cantidad del producto de expresión de, al menos, uno de los genes seleccionados de la lista que comprende: *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5*, en la muestra biológica aislada, por medio de cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento como, por ejemplo, pero sin limitarse, cebadores, sondas y todos aquellos reactivos necesarios para determinar la expresión de la proteína *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5*. Más preferiblemente, el kit comprende al menos una pareja de los cebadores que se recogen en la Tabla 1. (SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13/SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15/SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17/SEQ ID NO: 18 ó SEQ ID NO: 19/SEQ ID NO: 20,). El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, el uso de tampones, polimerasas, cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, agentes para prevenir la contaminación, etc.

En otra realización preferida, el kit de la invención comprende anticuerpos específicos de la proteína *ACSL1*, *ACSL2*, *ACSL3*, *ACSL4*, o *ACSL5*, anticuerpos secundarios o controles positivos y/o negativos. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc. En el caso de la detección por RTqPCR puede contener, pero sin limitarse,

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 los métodos de la invención.

5

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

10

Otro aspecto se refiere al uso del kit de la invención, para el diagnóstico, pronóstico, o seguimiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes. En una realización preferida, el kit comprenden una pareja de cebadores que se selecciona de la lista que comprende: SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 12, par SEQ ID NO: 13/SEQ ID NO: 14; par SEQ ID NO: 15/SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: par SEQ ID NO: 17/SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19/SEQ ID NO: 20, o cualquiera de sus combinaciones. En otra realización preferida, la enfermedad inflamatoria o autoinmune se selecciona de la lista que comprende: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, arteriosclerosis, hipertensión, diabetes no insulina dependiente tipo 2, síndrome metabólico, enfermedad de Crohn, o cualquiera de sus combinaciones. En una realización aún más preferida, la enfermedad inflamatoria o autoinmune es el lupus eritematoso sistémico.

25

Los términos "secuencia aminoacídica", "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 codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

30

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. Los

35

siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS

5

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores.

10

Niveles de expresión de los mRNA codificantes de ACSLs en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y su asociación a LES.

15

El objetivo de este estudio fue investigar el nivel de transcripción (relativo a un gen de referencia) de las isoformas ACSL1, 2, 3, 4, 5 en PBMC de 45 muestras de pacientes con LES y 35 controles sanos, mediante PCR cuantitativo a tiempo real, para su comparación y estudio de asociación.

Sujetos de estudio.

20

Para realizar estas medidas se han utilizado 45 pacientes con LES que cumplían ≥ 4 criterios revisados por la "American College of Rheumatology" (ACR) (Tan *et al.*, 1982. *Arthritis Rheum* 25:1271) (ver siguiente apartado: Diagnóstico en LES) que fueron reclutados de la Unidad de enfermedades Autoinmunes del Hospital Virgen de las Nieves. Todos los participantes fueron de raza blanca, caucasicos. Se excluyó los pacientes con LES que no fuesen monitorizados durante al menos 1 año por dicha unidad, así como pacientes con sospecha de infección activa u otra enfermedad que implique inflamación sistémica, excepto LES, en el momento de la inclusión.. Todos los participantes dieron consentimiento informado para participar en este estudio, el cual fue aprobado el comité de ética local. Los controles sanos proceden de donadores del banco de sangre de Granada, concretamente el material sanguíneo procede de las bolsas de sangre que se extraen rutinariamente, que pasan los test microbiológicos, pero no terminan de procesarse adecuadamente por defectos de volumen y constituyen bolsas de desecho.

35

Diagnóstico en LES.

El diagnóstico del lupus eritematoso sistémico (LES) se basa en 11 criterios, de los cuales se requieren 4 o más de estos criterios, ya sea en
5 secuencia o simultáneamente, durante cualquier intervalo de la observación. Estos criterios fueron publicados en 1982 por el comité de criterios diagnósticos y terapéuticos del "American College of Rheumatology" (ACR), y fueron revisados en 1992. Los criterios son los siguientes:

10

1. Erupción malar: Eritema fijo, plano o alto, sobre las eminencias malares, que no suele afectar los surcos nasogenianos.

15

2. Erupción discoide: Placas eritematosas altas, con descamación queratósica adherente y tapones foliculares; puede haber cicatrices atróficas en las lesiones más antiguas.

20

3. Fotosensibilidad: Erupción cutánea a causa de una reacción insólita a la luz solar, referida por el paciente u observada por el médico.

25

4. Úlceras bucales: Ulceración nasofaríngea, por lo común indolora, observada por un médico.

5. Artritis: Artritis no erosiva que afecta dos o más articulaciones periféricas, caracterizada por dolor a la palpación, tumefacción o derrame.

30

6. Serositis:

a. Pleuritis: Claro antecedente de dolor pleurítico o frote, o signos de derrame pleural, o bien

b. Pericarditis: comprobada por electrocardiograma o frote o signos de derrame pericárdico.

35

7. Trastorno renal:

a. Proteinuria persistente mayor a 0,5g/día o mayor de 3+ sino se ha cuantificado, o bien

b. Cilindros celulares: pueden ser de eritrocitos, hemoglobina, granulares, tubulares o mixtos.

8. Trastorno neurológico:

a. Convulsiones: en ausencia de tratamientos farmacológicos o alteraciones metabólicas conocidas; por ej. Uremia, cetoacidosis, o desequilibrio electrolítico, o bien

5 b. Psicosis: en ausencia de tratamientos farmacológicos o alteraciones metabólicas conocidas; por ej. Uremia, cetoacidosis, o desequilibrio electrolítico.

9. Trastorno hematológico:

10 a. Anemia hemolítica: con reticulocitosis, o bien

b. Leucopenia: menos de 4.000/mm³ en dos o en más ocasiones

c. Linfopenia: menos de 1.500/mm³ en dos o más ocasiones, o bien

15 d. Trombocitopenia: menos de 100.000/mm³ en ausencia de fármacos que produzcan esta alteración.

10. Trastorno inmunitario:

a. Preparación de células LE-positivas (Este ítem fue eliminado de los criterios diagnósticos en la revisión realizada en 1992), o bien

20 b. Anti-DNA: título anormal de anticuerpos contra DNA nativo, o bien

c. Anti-Sm: Presencia de anticuerpos contra antígeno nuclear Sm.

d. Hallazgo positivo de Anticuerpos antifosfolipídicos (AFL) basado en:

25 1. Nivel sérico anormal de anticuerpos anticardiolopina IgG o IgM,

2. Resultado positivo para anticoagulante lúpico utilizando un método estándar, o

30 3. Falso positivo en pruebas serológicas de sífilis (VDRL), que persiste

por lo menos durante 6 meses y se confirma por pruebas de *Treponema pallidum* o prueba de absorción de anticuerpo treponémico fluorescente (FTA-Abs).

35 11. Anticuerpo antinuclear: Un título anormal de ANA por inmunofluorescencia o análisis equivalente en cualquier momento y en

ausencia de medicamentos relacionados con el síndrome de lupus de origen farmacológico.

Material para análisis.

5

El material que se extrae de los pacientes es un volumen de 3 ml de sangre periférica con anticoagulante. La sangre es procesada por medio de centrifugación en gradiente de densidad, Concretamente se utilizó Histopaque 1077 de Sigma-Aldrich (referencia comercial 10771) siguiendo sus indicaciones técnicas (Sigma-Aldrich Inc., 3050 Spruce Street, St. Louis Mo 63103, USA) para obtener las células mononucleares de la sangre periféricas (siglas en inglés, PBMC, de *periferal blood mononuclear cells*) sin eritrocitos. Las PBMCs se procesan para obtener el RNA mediante el kit RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, cat. No. 74134. Quiagen es una marca comercial de AMBION, Inc., Austin, Texas). Dicho material se procesa para convertirlo en cDNA, mediante kits comerciales de conversión del RNA a cDNA que utilizan una enzima reverso transcriptasa, el material obtenido se denomina DNA complementario (cDNA), lo cual ya puede ser utilizado para su amplificación mediante termociclador a tiempo real (RT-PCR) que cuantificará las cantidades presentes de cDNA correspondiente a las diferentes isoenzimas de ACSLs. La cuantificación de estas moléculas se hace de manera relativa a la de la molécula de referencia de un gen de expresión constitutiva muy estable a lo largo del ciclo de la célula (UbcH5B) (Hamalainen *et al.*, 2001. *Anal Biochem.* Dec 1;299(1):63-70). Los oligonucleótidos para la amplificación de cada ACSL se indican a continuación:

30

35

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados

ACSL isoforma	Primer sequence 5'→3'
ACSL1	Directo: SEQ ID NO: 9 Reverso: SEQ ID NO: 10
ACSL3	Directo: SEQ ID NO: 11 Reverso: SEQ ID NO: 12
ACSL4	Directo: SEQ ID NO: 13 Reverso: SEQ ID NO: 14
ACSL5	Directo: SEQ ID NO: 15 Reverso: SEQ ID NO: 16
ACSL6 (ACSL2)	Directo: SEQ ID NO: 17 Reverso: SEQ ID NO: 18
UbcH5B (gen de referencia)	Directo: SEQ ID NO: 19 Reverso: SEQ ID NO: 20

Estadística utilizada para el análisis de los datos.

5

Los datos clínicos fueron recogidos en una base de datos creada en el programa estadístico SPSS para Windows, versión 15.0.

10

15

20

El análisis univariante de los valores que muestran las diferentes ACSLs, en dos grupos independientes (enfermos de lupus y controles sanos) se indica en la Tabla 2 como mediana con el rango intercuartílico. Se utilizó la prueba de Mann Whitney para determinar la significación estadística de las diferencias entre enfermos y controles. Para los análisis del efecto de las diferentes ACSL en lupus y determinar cuáles son las ACSL esenciales que describen mejor la probabilidad de lupus, se realizó regresión logística bimodal introduciendo como variables las diferentes series, esto es, la N, la A y la SI. Se indica en la tabla el coeficiente beta, la significación P y el efecto como odds ratio (OR) con 95% intervalo de confianza (95%IC). Igualmente, la regresión logística, se realizó con el grupo de enfermos de lupus para determinar los efectos de cada ACSL en las diferentes manifestaciones y criterios de diagnóstico de lupus. Se determinó al área bajo la curva (AUC) para determinar el valor predictivo de cada ACSL a partir de los datos de probabilidades de los diferentes

modelos de regresión logística multivariada condicional para seleccionar las ACSL independientes. Para el análisis de correlación se realizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson (con dos colas) (r) y Spearman. Regresión lineal múltiple se realizó para relacionar cada ACSL con parámetros cuantitativos de suero en lupus que constituyen factores de inflamación. Se indica en las tablas el coeficiente de regresión Beta, la significación P, y el coeficiente de determinación R^2 , para determinar el % de variación de ese factor que explica una unidad de variación de la ACSL considerada.

10

Resultados

Estos resultados indican que las ACSLs están claramente involucradas en la patología del LES. Hemos cuantificado los niveles de los mRNA codificantes de las ACSLs de varias condiciones. La primera de ellas es en células recién extraídas de la sangre de pacientes con LES o controles sanos. Estos valores son indicativos de los niveles de las ACSLs en PBMC (linfocitos y monocitos) en las condiciones fisiológicas en las que se encuentran en los enfermos o controles (se denominan con número y letra N, de no tratadas in vitro). La ACSL3N tiene una mediana de 18 (13.0-29.7) en controles sanos frente a 10 (8.1-15.3) en los enfermos de lupus.

20

Como se puede apreciar en la TABLA 2, comparado con personas sanas, las PBMCs de LES recién extraídas de pacientes y sin ningún tratamiento activador adicional (células normales, N) tuvieron significativamente más bajo nivel de ACSL1N ($P=0.008$) y ACSL3N ($P= 4.1 \times 10^{-4}$) pero fue mayor para ACSL5N ($P=3.4 \times 10^{-4}$).

25

La regresión logística multivariada de esta serie indica que las ACSL3N y 5N constituyen el mejor modelo predictivo de lupus, con un odds ratio (OR) de 0,83 para la 3N y de 1,14 para la 5N (TABLA 3). El área bajo la curva para este modelo es 0,888 que indica una alta capacidad diagnóstica de lupus (TABLA 4) frente a controles sanos.

30

35

Cuando se analizan estos factores mediante análisis de asociación no-paramétrica o correlación de Spearman, únicamente en el grupo de

enfermos, en relación con diferentes manifestaciones que ocurren en lupus, concretamente, con los 11 criterios de diagnóstico clínico de lupus (ver TABLA 3 y TABLA 4), o con los índices de actividad, la ACSL2N correlaciona moderada e inversamente con el Índice de daño orgánico acumulado crónico (SLICC/ACR Damage index) ($r = -0.314$, $P = 0.048$), con los niveles de homocisteína, e IL-2. ACSL5N correlaciona con los niveles de IL6 que a su vez es un factor inflamatorio importante, y con la presencia de manifestaciones clínicas hematológicas (hemogl.= anemia hemolítica), e inversamente con el tratamiento de corticoides. De la misma manera, dentro del grupo de enfermos con LES, los niveles de ACSL5 correlacionan con el tratamiento de los pacientes con corticoides lo que sugiere que los tales niveles pueden estar afectados por dicho tratamiento.

Otra fuente de cuantificación de las ACSLs es a partir de PBMCs que han sido estimuladas en cultivo durante 24 horas con un potente activador celular y mitógeno (PMA + Ionomicina) (se denominan con número y letra A, de activadas). Los valores obtenidos en este caso para las distintas ACSLs son indicativos, más que del estatus del sistema inmunológico de las personas de las que proceden las muestras, del potencial máximo de respuesta de tales células. En este tipo de medida, sólo la ACSL1A y la 2A son significativamente diferentes. Así Los valores que van desde 47.8 a 71,5 son específicos de lupus. Para la 2A, los valores que van desde 0,28 hasta 0,6, que son la mayoría, se dan sólo en lupus. Se aprecia en la TABLA 2, que la expresión relativa fue más alta en LES frente a los controles para la ACSL1(A) ($P = 3.8 \times 10^{-4}$) y ACSL2A ($P = 1.9 \times 10^{-5}$), quedando las otras sin cambiar significativamente con la activación de las PBMCs. La regresión logística indica que la 1A y la 5A son variables independientes que mejor explican la aparición de lupus (TABLA 3) y el área bajo la curva es de 0,918, reflejando una gran capacidad predictiva. Dentro del grupo de pacientes con LES y estratificando en base a tener o no tener alguna de las manifestaciones clínicas anteriormente indicadas (ver TABLA 2 y TABLA 3), la ACSL1A se asocia con el subgrupo que padece manifestaciones cutáneas ($P = 0.019$), ACSL2A correlaciona moderada e inversamente tanto con el índice de actividad lúpica SLEDAI ($r = -0.375$, $P = 0.017$) como con la proteína C reactiva (PCR, $r = -0.400$,

P=0.011) factor ampliamente asociado al proceso inflamatorio en muchas enfermedades y procesos infecciosos.

Un parámetro que hemos establecido para equilibrar diferencias debidas a factores no visibles entre valores obtenidos de células normales y activadas, con PMA+lo, de la misma muestra, y para que sean más extrapolables y similares a cuantificaciones realizadas en otros laboratorios e incluso en otras enfermedades o situaciones, es el índice de estimulación (stimulation index, SI). Stimulation index (SI), el cociente entre los niveles de ACSLs de PBMC activadas y normales fue significativamente mayor en LES para la ACSL1SI (P= 4.9×10^{-7}), ACSL2SI (P= 0.001), ACS3SI (P= 1.0×10^{-6}), y ACSL4SI (P=0.013), pero fue inferior para la ACSL5SI (P= 1.8×10^{-5}) como se muestra en la TABLA 1. Cuando se analizan estos valores dentro del grupo con lupus, estratificando como antes por tener o no tener una condición patológica determinada o por análisis de correlación (ver TABLA 3 y TABLA 4), encontramos que ACSL1A, 1SI y 3SI se asocia con manifestaciones cutáneas (P=0.021) y complicaciones renales (P=0.017); ACSL3SI se asocia con manifestaciones cutáneas (P=0.019), complicaciones renales (P=0.002), y correlaciona inversamente con los niveles de PCR (r=-0.446, P=0.004). ACSL4SI se asocia con problemas articulares (P=0.003), renales (P=0.038), hematológicos (P=0.0034), y correlaciona inversamente con los niveles de PCR (r= - 0.316, P= 0.047). Las ACSL2SI y la ACSL5SI no mostraron asociación o correlación con ninguna manifestación patológica listada.

Conclusiones

Por lo tanto, sugerimos que los desequilibrios en la expresión de las diferentes ACSLs en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) en situación fisiológica (controles sanos) o patofisiológica (lupus) puede contribuir a la patogénesis del lupus, concretamente los valores de expresión de los genes de las ACSL1N, 3N, 4N, 1A, 2A, 1SI, 2SI, 3SI, 4SI y 5SI. Igualmente pueden contribuir según su nivel de expresión a las manifestaciones de eritemas faciales (ACSL1A, 5A), fotosensibilidad (ACSL1N), articulares (ACSL4SI), úlceras orales (ACSL5N), renales (ACSL3SI), hematológicas (ACSL4SI) y neurológicas (ACSL4A) y

presencia de anticuerpos anti-DNA (ACSL1A) y que en conjunto, como sugerencia preliminar, las ACSLs pueden representar nuevas dianas para el tratamiento del lupus. Las medidas o cuantificaciones de las diferentes ACSLs pueden ser de utilidad como marcadores y en la pronta
 5 identificación de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas de lupus e indicar respuesta al tratamiento en pacientes con patología activa.

Tabla 2

10 Niveles de expresión relativa (mRNA) de las diferentes ACSLs en lupus y controles sanos. La cuantificación se realiza en células PBMCs sin tratar (serie N), in vitro activadas (serie A) y del ratio entre activadas / no activadas (A/N) denominado Stimulation index (SI). Los niveles relativos de
 15 ACSLs se presentan como la mediana (rango) y significación estadística de la diferencia de la comparación entre lupus y controles se realizada mediante la prueba de Mann-Whitney.

ACSL	Controles sanos n = 35	Pacientes LES^a n = 43	P_{M-W}^b
<u>De PBMCs no tratadas (N)</u>			
1N	77.2 (37.3-110.0)	49.0(31.0-66.9)	0.008
2N	0.09 (0.03-0.18)	0.06(0.03-0.12)	NS
3N	18.0 (13.0-29.7)	10.0(8.1-15.3)	4.1 x 10 ⁻⁴
4N	1.6 (0.6-3.5)	1.6 (0.7-2.3)	NS
5N	15.3 (9.3-20.0)	24.7(16.8-43.3)	3.4 x 10 ⁻⁴
<u>De PBMCs activadas (A)</u>			
1A	30.2 (20.2-47.8)	55.3(30.7-71.5)	3.8 x 10 ⁻⁴
2A	0.09 (0.01-0.28)	0.4(0.2-0.6)	1.9 x 10 ⁻⁵
3A	20.5 (12.0-33.8)	22.3(18.8-29.5)	N.S.
4A	2.9 (1.1-4.4)	3.1(1.6-4.1)	N.S.
5A	72.7 (33.2-128.3)	52.9(33.7-75.8)	N.S.
<u>Stimulation index (SI = A/N)</u>			

1SI	0.46 (0.27-0.66)	1.1(0.6-1.7)	4.9×10^{-7}
2SI	1.09 (0.00-5.12)	5.9(1.9-9.6)	0.001
3SI	1.18 (0.79-1.55)	2.1(1.7-3.0)	1.0×10^{-6}
4SI	1.3 (0.71-2.43)	2.2(1.4-3.0)	0.013
5SI	5.1 (2.5-6.8)	1.9(1.2-3.4)	1.8×10^{-5}

Tabla 3

5 Regresión logística para delimitar las variables ACSL independientes que explican mejor la probabilidad de tener lupus. Se ajusta un modelo para cada serie (N, A y SI). Se indica el coeficiente beta, la significación P y el OR con el 95% intervalo de confianza.

ACSL	Beta	P	OR, (95% CI)
<u>De PBMCs^a no tratadas (N)</u>			
3N	-0.177	2.45×10^{-5}	0.838 (0.772-0.910)
5N	0.136	6.8×10^{-5}	1.146 (1.072-1.226)
<u>De PBMCs^b in vitro activadas (A)</u>			
1A	0.125	6.17×10^{-5}	1.13 (1.066-1.205)
5A	-0.043	1.18×10^{-5}	0.958 (0.937- 0.979)
<u>Stimulation index (SI = A/N)^c</u>			
1SI	3.44	0.005	31,2 (2.9-336)
3SI	1.096	0.017	2.99 (1.2-7.37)
5SI	-0.773	0.001	0.46 (0.29-0.72)

- 10 a) Variables incluidas en el modelo: ACSL1N, 2N, 3N, 4N, 5N.
 b) Variables incluidas en de modelo: ACSL1A, 2A, 3A, 4A, 5A.
 c) Variables incluidas en el modelo: ACSL1SI, 2SI, 3SI, 4SI, 5SI.

Tabla 4

Área bajo la curva (AUC) de los diferentes modelos de regresión logística.

ACSL	AUC (95% CI)	EE	P
3N, 5N	0,888 (0,814-0,961)	0,037	$4,3 \times 10^{-9}$
1A, 5A	0,918 (0,858-0,978)	0,031	$2,5 \times 10^{-10}$
1Si, 3Si, 5Si	0,931 (0,879-0,983)	0,027	$6,7 \times 10^{-11}$

5

AUC, área bajo la curva; EE, error estándar; P, probabilidad.

10

Tabla 5 (página siguiente) Análisis de asociación y cantidad expresión de las diferentes ACSL entre los grupos que tienen (si) y que no tienen (no) la manifestación lúpica indicada con el número de muestras en cada grupo. Se indica además en la línea inferior de cada ACSL la significación P. No significativo se indica con "n.s". Estadística: se utiliza contraste no paramétrico para 2 grupos independientes y variable dependiente ordinal

(afectaciones clínicas 0= no, 1 = si) con la prueba de Mann Whitney.

<i>ACSL QUE MUESTRAN ASOCIACIÓN</i>							
<i>AFECTACIONES EN</i>	<i>1A</i>	<i>1SI</i>	<i>3SI</i>	<i>4N</i>	<i>4A</i>	<i>4SI</i>	<i>5SI</i>
<i>LUPUS</i>							
<i>ERITEMA FACIAL</i> no=10 / si =30							27 / 18,2 P=0,032
<i>CUTÁNEO</i> no=26 / si =14	23,6 / 14,6 P=0,019	23,6 / 14,7 P=0,022	23,6 / 14,7 P=0,019				
<i>FOTOSENSIBILIDAD</i>	n.s.						
<i>ÚLCERAS ORALES</i>	n.s.						
<i>ARTRITIS</i> no=4 / si =36				5,6 / 22,1 P=0,003		35,5 / 18,8 P=0,003	
<i>SEROSITIS</i>	n.s.						
<i>AFECT. NEUROLÓGICA</i> no=31 / si = 9							
<i>AFECT. RENAL</i> no=29 / si =11		17,8 / 27,6 P=0,017	17 / 29 P=0,002		22,9 / 14,2 P=0,035		18,1 / 26,7 P=0,038
<i>AFECT. HEMATOLÓGICA</i> no=27 / si =13					23,8 / 13,65 P=0,009		17,78 / 26,15 P=0,034
<i>ANTI-DNA</i> no=7 / si =33	28,4 / 18,82 P=0,049						

Tabla 6

Regresión logística para delimitar las variables ACSL independientes que explican mejor la probabilidad de tener la manifestación lúpica indicada. Se ajusta un modelo para cada serie (N, A y SI). Se indica el coeficiente beta, la significación P y el OR con el 95% intervalo de confianza.

5

Manifestaciones	ACSL	Beta	P-value	OR (95% CI)
1)ERITEMA FACIAL (10/30)	3A 5A	0.174 -0.074	0.032 0.006	1.19 (1.015-1.396) 0.93 (0.881-0.98)
2)CUTÁNEO (26/14)	N.S.			
3)FOTOSENSIBILIDAD (10/30)	1N	-0.034	0.029	0.97 (0.94-0.98)
4) ARTRITIS (4/36)	4SI	-0.636	0.011	0.530 (0.32-0.86)
5)ÚLCERAS BUCALES (17/23)	5N	-0.076	0.009	0.93 (0.88-0.98)
6)SEROSITIS (31/9)	N.S.			
7)AFECT. NEUROLOGICAS (31/9)	4A	-0.732	0.045	0.48 (0.23-0.98)
8)AFECT. RENAL (9/11)	3SI	1.392	0.011	4.023 (1.38-11.74)
9)AFECT. HEMATOLÓGICA (27/13)	4SI	0.542	0.02	1.72 (1.09-2.71)
10) ANA. (0/40)	N.S.			
11) ANTI-DNA. (7/33)	1A	-0.024	0.052	8 (0.95-1.00)

a) **Source:** Tan EM, et al., 1982. *Arthritis Rheum* 25:1271, 1982.

N.S., no significativo.

Tabla 7

Análisis de correlacion de Spearman.

PARÁMETRO	ACSL	r	P
SLICC	2N	-0,314	0,048
SLEDAI	2A	-0,375	0,017
HOMOCISTEÍNA	2N	-0,415	0,009
HEMATÍES	2A	0,349	0,027
PCR	2A	-0,400	0,011
VSG	4A	-0,417	0,007
IL-2	2N	-0,415	0,009
	5SI	-0,376	0,018
IL-6	3A	0,326	0,04
	5N	0,312	0,05
IL-8	4N	0,359	0,031
	4SI	-0,349	0,037

REIVINDICACIONES

1. Uso de los genes de la familia de las Acil-Coenzima A sintetasas de cadena larga (*ACSLs*) o de sus productos de expresión, como marcadores para el diagnóstico, pronóstico, o seguimiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes.
2. Uso de los genes de la familia de las Acil-Coenzima A sintetasas de cadena larga (*ACSLs*) o de sus productos de expresión según la reivindicación anterior, donde la enfermedad inflamatoria o autoinmune se selecciona de la lista que comprende: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, arteriosclerosis, hipertensión, diabetes no insulina dependiente tipo 2, síndrome metabólico, enfermedad de Crohn, o cualquiera de sus combinaciones.
3. Uso de los genes de la familia de las Acil-Coenzima A sintetasas de cadena larga (*ACSLs*) o de sus productos de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la enfermedad inflamatoria o autoinmune es el lupus eritematoso sistémico (LES).
4. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes, que comprende:
 - a. obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y
 - b. detectar la cantidad del producto de expresión de, al menos, uno de los genes de la familia de las Acil-Coenzima A sintetasas de cadena larga (*ACSLs*) en la muestra aislada de (a).
5. Método según la reivindicación anterior, que además comprende:
 - c. comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, donde la muestra biológica aislada de un individuo del paso (a) comprende células mononucleares de sangre periférica (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs).

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, donde los genes de la familia de las ACSLs se seleccionan de la lista que comprende: *ACSL1*, *ACSL2* (*ACSL6*), *ACSL3*, *ACSL4*, *ACSL5*, o cualquiera de sus combinaciones.
- 5
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, donde la enfermedad inflamatoria o autoinmune se selecciona de la lista que comprende: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, arteriosclerosis, hipertensión, diabetes no insulina dependiente tipo 2, síndrome metabólico, enfermedad de Crohn, o cualquiera de sus combinaciones.
- 10
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-8, donde la enfermedad inflamatoria o autoinmune es el lupus eritematoso sistémico.
- 15
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-9, que además comprende asignar al individuo del paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico cuando presenta una cantidad de producto de expresión de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: *ACSL1*, *ACSL3*, *ACSL5SI*, o cualquiera de sus combinaciones, detectados en el paso (b) menor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia.
- 20
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-10, y que además comprende asignar al individuo del paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico cuando presenta una cantidad de de producto de expresión de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: *ACSL1A*, *ACSL1SI*, *ACSL2A*, *ACSL2SI*, *ACSL3SI*, *ACSL4SI*, *ACSL5*, o cualquiera de sus combinaciones, detectados en el paso (b) mayor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia.
- 25
- 30
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-11 que además comprende asignar al individuo del paso (a) al grupo de individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico con manifestaciones
- 35

renales cuando presenta una cantidad de producto de expresión del gen *ACSL3SI* detectado en el paso (b) mayor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia.

- 5 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-12 que además
comprende asignar al individuo según del paso (a) al grupo de
individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico con
manifestaciones hematológicas cuando presenta una cantidad de
10 producto de expresión del gen *ACSL4SI* detectado en el paso (b)
mayor y estadísticamente significativa en comparación con una
cantidad de referencia.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-14 que además
comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de
15 individuos con enfermedad de lupus eritematoso sistémico con
manifestaciones neurológicas cuando presenta una cantidad de
producto de expresión del gen *ACSL4A* detectado en el paso (b)
menor y estadísticamente significativa en comparación con una
cantidad de referencia.
- 20 15. Kit de diagnóstico que comprenden una pareja de cebadores que se
selecciona de la lista que comprende: SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 10;
SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 12, par SEQ ID NO: 13/SEQ ID NO: 14;
par SEQ ID NO: 15/SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: par SEQ ID NO:
25 17/SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19/SEQ ID NO: 20, o cualquiera de
sus combinaciones.
16. Uso del kit de diagnóstico según la reivindicación anterior, para el
diagnóstico, pronóstico, o seguimiento de enfermedades inflamatorias
30 o autoinmunes

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070287

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)

C12N, C12Q, G01N

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, INVENES, WPI, NPL, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BIANCA KNOCH ET AL. "Study of the effects of dietary polyunsaturated fatty acids: Molecular mechanisms involved in intestinal inflammation" GRASAS Y ACEITES, vol 60, no.1, 2009, pages 8-21. Page 8, column derecha, segundo paragraph; page 12, column izquierda paragraph 3.1	1-16
A	WO02/08274 A2 (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.) 31.01.2002, Page 80, lines 11-34; page 89, lines 14-39.	1-16
A	JOSE C. CRISPIN ET AL "Phatogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances" TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE vol 16, no. 2, February 2010, pages 47-57. Page 54, column derecha, penúltimo paragraph.	1-16

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>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
07/07/2011

Date of mailing of the international search report
(10/08/2011)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
S. González Peñalba

Telephone No. 91 3493025

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2011/070287

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO0208274 A	31.01.2002	AU7710901 A US2002164320 A EP1358339 A EP20010954892 US2004214758 A US2006035362 A US7160693 B	05.02.2002 07.11.2002 05.11.2003 23.07.2001 28.10.2004 16.02.2006 09.01.2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070287

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N9/00 (2006.01)
C12Q1/00 (2006.01)
G01N33/48 (2006.01)
G01N33/564 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070287

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)
C12N, C12Q, G01N

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, INVENES, WPI, NPL, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	BIANCA KNOCH ET AL. "Study of the effects of dietary polyunsaturated fatty acids: Molecular mechanisms involved in intestinal inflammation" GRASAS Y ACEITES, vol 60, no.1, 2009, páginas 8-21. Página 8, columna derecha, segundo párrafo; página 12, columna izquierda apartado 3.1	1-16
A	WO02/08274 A2 (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.) 31.01.2002, Página 80, líneas 11-34; página 89, líneas 14-39.	1-16
A	JOSE C. CRISPIN ET AL "Phatogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances" TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE vol 16, no. 2, febrero 2010, páginas 47-57. Página 54, columna derecha, penúltimo párrafo.	1-16

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

* Categorías especiales de documentos citados:	"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.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"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.
"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).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
07/07/2011

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
10-AGOSTO-2011 (10/08/2011)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
S. González Peñalba
Nº de teléfono 91 3493025

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2011/070287

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO0208274 A	31.01.2002	AU7710901 A	05.02.2002
		US2002164320 A	07.11.2002
		EP1358339 A	05.11.2003
		EP20010954892	23.07.2001
		US2004214758 A	28.10.2004
		US2006035362 A	16.02.2006
		US7160693 B	09.01.2007
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070287

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C12N9/00 (2006.01)

C12Q1/00 (2006.01)

G01N33/48 (2006.01)

G01N33/564 (2006.01)