



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 324 083**

② Número de solicitud: 200702770

⑤ Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **22.10.2007**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **29.07.2009**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
29.07.2009

⑦ Solicitante/s:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, nº 117
28006 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Salvador Sánchez, Jesús María;
López Santalla, Mercedes y
Martínez Alonso, Carlos**

⑦ Agente: **Ungría López, Javier**

⑤ Título: **Procedimiento para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades que cursan con alteración de la quinasa p38, elementos necesarios para llevarlo a cabo y sus aplicaciones.**

⑤ Resumen:

Procedimiento para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades que cursan con alteración de la quinasa p38, elementos necesarios para llevarlo a cabo y sus aplicaciones.

La presente invención se refiere a un nuevo método para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, desórdenes o patologías que cursan con alteración en la quinasa p38, preferentemente para enfermedades, desórdenes o patologías de origen autoinmune, inflamatorio o tumoral, (y más preferentemente para la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico), basado en la detección y cuantificación *in vitro* de la fosforilación de la Y323 de p38 y la regulación de su actividad, respectivamente, mediante el uso de un anticuerpo policlonal fosfoespecífico de dicho residuo. De esta manera se incluyen composiciones farmacéuticas útiles para dicho tratamiento y diagnóstico que comprenden un anticuerpo policlonal específico de dicha forma fosforilada proteica.

ES 2 324 083 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades que cursan con alteración de la quinasa p38, elementos necesarios para llevarlo a cabo y sus aplicaciones.

5

Campo de la técnica

Sector farmacéutico, biomédico e investigación académica. Concretamente la invención describe la generación y caracterización de anticuerpos fosfoespecíficos como herramientas de diagnóstico y marcador pronóstico y de remisión en ensayos clínicos de enfermedades humanas, más concretamente enfermedades autoinmunes y tumorales.

10

Estado de la técnica

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) regulan funciones críticas en el sistema inmune, incluyendo activación, proliferación, apoptosis y diferenciación de células T¹⁻⁶. En la última década, las MAPK han despertado un enorme interés en la industria farmacéutica como posibles dianas farmacológicas en numerosas enfermedades. Se han identificado cuatro grupos de MAPKs conocidas como p38 MAPK, ERK, JNK y ERK5⁵⁻¹⁰. La quinasa p38 se activa por distintos tipos de estrés incluidos estrés osmótico, radiación ultravioleta o citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF α ¹¹⁻¹³. La señalización de p38 está implicada en importantes procesos fisiológicos como la producción de citoquinas, respuesta inflamatoria, funciones inmune y renal, respuesta a estrés oxidativo, autoinmunidad, y supresión tumoral^{14,15}. A nivel celular, la activación de p38 controla numerosos procesos, incluyendo la regulación de factores de transcripción, síntesis de proteínas, expresión de receptores de membrana, regulación de proteínas de ciclo celular, inducción de senescencia y activación de apoptosis.

15

20

25

30

35

En las células de mamífero la actividad de p38 está regulada por una compleja cascada de fosforilación conocida como el mecanismo clásico de activación de MAPKs¹⁰. Diferentes citoquinas proinflamatorias estimulan GTPasas que a su vez activan las quinasas MKK3, MKK4 y MKK6 que fosforilan p38 en los residuos de Thr180-Tyr182, aumentando su actividad^{16,17}. Aunque se asumía que en las células T la activación de p38 está regulada exclusivamente por el mecanismo clásico de activación, recientemente se ha descubierto un sitio regulador crítico en la activación de p38, la tirosina en la posición 323. Se ha identificado una vía novel que acopla la estimulación del receptor de célula T (TCR) a la activación de p38 por un mecanismo independiente de MAPK. Esta ruta alternativa de activación de p38, está mediada por la tirosina quinasa Zap70¹⁸. La estimulación del TCR activa la proteína quinasa Lck, que fosforila a Zap70. Esta tirosina quinasa fosforila p38 en un residuo de tirosina situado en la posición 323. La fosforilación en la Tyr323 induce un proceso de autofosforilación y activación de p38 (Salvador *et al* Nat. Immunol, 2005, Solicitud de patente N° WO 2005/077983).

Aunque la actividad de p38 se ha implicado en procesos inflamatorios, autoinmunes y cáncer, no se conoce en profundidad la función de esta ruta alternativa de activación de p38 en estos procesos, ni la implicación directa y específica con enfermedades concretas o si es una característica general de todas estas enfermedades descritas, que permitan desarrollar nuevas aplicaciones diagnósticas o terapéuticas específicas de las mismas. Por otro lado, para analizar la relevancia fisiológica de la ruta alternativa de activación de p38 en estos procesos patológicos es necesario generar herramientas metodológicas que permitan monitorizar y cuantificar con exactitud el grado de fosforilación del residuo de Tyr323 de p38 y al mismo tiempo mediante muestras biológicas adecuadas a estas células sanguíneas. Para ello, los inventores se propusieron desarrollar un anticuerpo fosfoespecífico frente a la Tyr323 de p38 que pudiera usarse en citometría de flujo. La citometría de flujo aporta numerosas ventajas con respecto al western-blot y tiene una aplicación directa en estudios poblacionales.

40

45

Descripción de la invención

50

Descripción breve

Un aspecto de la presente invención lo constituye un procedimiento de diagnóstico y pronóstico de una enfermedad autoinmune, en adelante procedimiento de diagnóstico de la invención, basado en la determinación *in vitro* del nivel de fosforilación de la quinasa p38 en el residuo tirosina Y323 en células del sistema inmune, en una muestra biológica que comprende las siguientes etapas:

55

- a) identificación o determinación del nivel de fosforilación de la quinasa p38 en el residuo tirosina Y323, en una muestra biológica, preferentemente sangre y con células del sistema inmune,
- b) comparación de dicha determinación observada en a) con una muestra biológica control, y
- c) diagnóstico y/o pronóstico de una enfermedad autoinmune cuando los niveles fosforilación superan a los obtenidos en la muestra control.

60

65

Un aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de diagnóstico de la invención donde la determinación de a) se realiza con un anticuerpo específico de la tirosina fosforilada (pY323) de la quinasa p38, más preferentemente, un anticuerpo policlonal, y más preferentemente, con un anticuerpo policlonal específico del péptido

ES 2 324 083 A1

sintético de SEQ ID NO1, como el anticuerpo anti pY323 (anti-pTyr323) desarrollado en la presente invención (ver Ejemplos).

5 Un aspecto más particular de la invención lo constituye el procedimiento de diagnóstico de la invención donde la determinación de a) se realiza mediante citometría de flujo donde se seleccionan linfocitos T de la muestra biológica, preferentemente sangre.

10 Otro aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que la enfermedad autoinmune que se diagnóstica pertenece al siguiente grupo: lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que la enfermedad autoinmune que se diagnóstica en c) se lleva a cabo por la identificación de unos niveles similares a los obtenidos en el grupo control y que pertenece al siguiente grupo: espondilitis anquilosante.

15 Otro aspecto de la invención lo constituye un anticuerpo útil para el diagnóstico y diferenciación, pronóstico y seguimiento de enfermedades autoinmunes, en adelante anticuerpo de la invención, que comprende un anticuerpo de isotipo IgG específico del aminoácido Tyr323 fosforilado de la quinasa p38 α .

20 Otro aspecto particular lo constituye un anticuerpo de la invención, ya sea monoclonal o policlonal, específico del péptido sintético de p38 α (VADPpYDQSFE) (SEQ ID NO1), y más preferentemente un anticuerpo policlonal específico del péptido sintético de p38 α (VADPpYDQSFE) (SEQ ID NO1).

25 Otro aspecto de la invención lo constituye el procedimiento de obtención del anticuerpo de la invención, en adelante procedimiento de la invención, basado en la generación del anticuerpo de la invención, preferentemente un anticuerpo policlonal, que comprende las siguientes etapas:

30 i) inmunización del animal mediante un péptido que contenga una tirosina fosforilada (Tyr323) representativa de la Tyr323 fosforilada de la proteína p38, preferentemente con el péptido VADPpYDQSFE ((319-328)-C(pY323), SEQ ID NO1),

ii) una etapa de purificación de los anticuerpos de isotipo IgG,

35 iii) una etapa de purificación de los anticuerpos que reconocen el péptido VADPpYDQSFE ((319-328)-C(pY323) fosforilado, por ejemplo, la IgG se pasa a través de una columna tiopropilsefarosa 6B acoplada con el péptido p38 α (319-328)C(323pY), y opcionalmente

iv) preparación del anticuerpo del anticuerpo de la invención para posteriores estudios.

40 Otro aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que el antígeno utilizado para inmunizar el animal de i) es el péptido VADPpYDQSFE ((319-328)-C(pY323), SEQ ID NO1).

45 Finalmente, otro aspecto de la invención lo constituye el uso-del anticuerpo de la invención en el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento, en adelante uso del anticuerpo de la invención, *in vitro* de enfermedades, desórdenes o patologías que cursan con alteración de la quinasa p38.

Además, el anticuerpo de la invención puede ser utilizado, además del anterior uso como herramienta de diagnóstico, en otros procedimientos biotecnológicos de identificación de la proteína p38 fosforilada en la Y323 pertenecientes, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo:

50 i) procedimiento de identificación de compuestos que alteran, preferentemente inhibidores, la actividad de la proteína p38 mediada por dicha Y323 fosforilada, o en un

55 ii) procedimiento de elaboración de una composición terapéutica útil para el tratamiento de enfermedades que cursen con una alteración de la expresión de esta forma fosforilada Y323 de p38.

Otro aspecto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o un medicamento útil para el tratamiento de enfermedades que cursen con alteración de la proteína p38 fosforilada en Y323, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto inhibidor de dicha proteína, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

60 Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto inhibidor es un anticuerpo específico de la proteína p38 fosforilada en Y323, ya sea monoclonal o policlonal, preferentemente un anticuerpo policlonal específico del péptido de secuencia SEQ ID NO1.

65 Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un método de tratamiento de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una enfermedad que cursa con alteración de la expresión de la proteína p38 fosforilada en Y323, en adelante uso de la composición farmacéutica de

la presente invención, consistente en la administración de dicha composición terapéutica que inhibe la actividad de dicha proteína.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en el que la enfermedad pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: enfermedades autoinmunes -preferentemente, lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide-, alérgicas, inflamatorias, alteraciones linfoproliferativas como leucemias y cánceres.

Descripción detallada

La invención se enfrenta al problema de proporcionar nuevas herramientas biotecnológicas y procedimientos que permitan diagnosticar y monitorizar la gravedad de enfermedades humanas, preferentemente enfermedad autoinmunes.

En primer lugar, es importante destacar que no existen anticuerpos fosfoespecíficos de uso comercial frente a la Tyr323 de p38, aunque existe descrito un anticuerpo policlonal frente a la Tyr323p38 generado en el National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA, cuyo uso está exclusivamente reducido para western blot, lo cual indica que ciertas técnicas útiles para el laboratorio no son aproximaciones reales cuando se quieren aplicar como aproximación diagnóstica en la práctica clínica con pacientes.

Para ello, en la presente invención se ha modificado la metodología utilizada hasta ahora en la generación y purificación del anticuerpo frente a la Tyr323 de p38, más concretamente contra el péptido VADPPYDQSFE ((319-328)-C(pY323), SEQ ID NO1). La generación de anticuerpos policlonales no es trivial y la metodología empleada para su generación es muy importante para poder obtener resultados reproducibles. Una pequeña variación da lugar a la generación de diferentes anticuerpos policlonales cuyas características darán lugar a la posibilidad o no de su utilización en diferentes aplicaciones. Hasta ahora, el suero del animal inmunizado, conejo en este caso, se había purificado en dos pasos: en el primero, se obtenían los anticuerpos que reconocían el péptido fosforilado mediante una columna de cromatografía de afinidad, y en el segundo, se eliminaban los anticuerpos que reconocían el péptido sin fosforilar¹⁸. En cambio en la presente invención, primero se purificaron los anticuerpos de isotipo IgG y, segundo, aquellos que reconocían el péptido fosforilado. Esto permitió la obtención de anticuerpos policlonales diferentes, principalmente seleccionados en el isotipo IgG, que aunque sean capaces de unirse al residuo de Tyr323 fosforilado no lo hacen en las mismas condiciones. Para cada aplicación se utilizan diferentes reactivos así que los diferentes anticuerpos policlonales obtenidos pueden variar su eficacia según la técnica en la que se utilicen.

Los experimentos de dot-blot y de enzimoimmunoensayo permiten confirmar que el anticuerpo policlonal IgG de la presente invención reconoce la proteína fosforilada y no reconoce la proteína sin fosforilar en este residuo (Figura 1A y 1B). Con el resto de estudios realizados utilizando la citometría de flujo y el western-blot se ha llegado a la misma conclusión, en ellos se observa como el anticuerpo IgG de la invención permite distinguir, tras activación de las células T, la fosforilación de p38 en la Tyr323, de p38 sin fosforilar en el mismo residuo o fosforilado en el residuo dual Thr180/Tyr182 (Figura 1). Esta especificidad no se había conseguido con anterioridad en anticuerpos fosfoespecíficos frente a la Tyr323 de p38, y permite utilizar el anticuerpo sin necesidad de purificar las muestras analizadas.

Además, en esta invención se proporciona un nuevo procedimiento para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedades de origen autoinmune, inflamatorio o tumoral, preferentemente para la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico, basado en la detección y cuantificación mediante citometría de flujo de la fosforilación de la Y323 de la proteína p38 α mediante el uso de un anticuerpo IgG fosfoespecífico, preferentemente policlonal, generado frente a dicho residuo. Dicho método permite el análisis de muestras de un modo rápido y sencillo, sin necesidad de purificar las células analizadas, y permite cuantificar la señal, por lo que aporta información sobre la gravedad de la enfermedad. Por primera vez, en la presente invención se ha generado un anticuerpo fosfoespecífico frente a la Tyr323 de p38 que permite su uso por citometría de flujo.

Gracias a la puesta a punto de esta herramienta, se han podido analizar en total más de 200 muestras de pacientes con enfermedades distintas autoinmunes y de controles sanos, permitiendo identificar sorprendentemente que la fosforilación de la Tyr323 de p38 es un proceso característico de ciertas enfermedades autoinmunes, no de todas ellas, preferentemente la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico, y, más sorprendentemente todavía, que el grado de fosforilación es un marcador del grado de actividad/gravedad de la enfermedad.

La monitorización del grado de fosforilación de p38 en la -Tyr323 mediante citometría tiene numerosas ventajas. Por un lado, permite el análisis de muestras de un modo rápido y sencillo a partir de un número de células muy inferior al utilizado por otras técnicas bioquímicas convencionales (i.e. western blot), sin necesidad de purificar las células analizadas. Además, permite cuantificar la señal, por lo que puede usarse en estudios poblacionales¹⁹⁻²². Basándose en estas ventajas técnicas, se ha podido analizar el grado de fosforilación de la Tyr323 en células T procedentes de sangre periférica de pacientes con distintas enfermedades autoinmunes. La mayor parte de los pacientes con enfermedades autoinmunes tienen un reducido número de células T (leucopenia) en sangre periférica lo que dificulta el análisis metodológico. Gracias a la generación y caracterización de este anticuerpo fosfoespecífico se ha podido analizar un número significativo de muestras de voluntarios sanos y de pacientes con diferentes enfermedades autoinmunes incluidas: espondilitis anquilosante, artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico. Se ha observado que la fosforilación del residuo de Tyr323 de p38 es significativamente superior ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis) en los linfocitos T de los individuos con lupus eritematoso sistémico y con artritis reumatoide a la fosforilación de la Y323 en los linfocitos T

de los individuos con espondilitis anquilosante y del grupo de controles sanos, indicando que la fosforilación de este residuo es un buen marcador de ciertas enfermedades autoinmunes sistémicas frente a otras y con respecto a un ser humano sano (Figura 3). En este caso, el diagnóstico de enfermedad autoinmune incluye el diagnóstico diferencial de varias enfermedades autoinmunes, es decir, el diagnóstico positivo de varias ellas frente al diagnóstico negativo de otras, todo lo cual es extremadamente útil en la práctica clínica.

Además, gracias a que la citometría de flujo permite cuantificar la señal, se ha visto que hay una correlación importante entre el grado de fosforilación de la Tyr323 de p38 y la progresión de la enfermedad. En artritis reumatoide se ha observado una correlación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre la fosforilación del residuo de Tyr323 de linfocitos T y el índice clínico DAS28 (Disease Activity Score). El DAS28(VSG) es un dato clínico que mide actividad de la enfermedad y se obtiene teniendo en cuenta la velocidad de sedimentación globular (VSG) y la evaluación global del paciente²³⁻²⁴. La fosforilación en la Tyr323 de p38 fue mayor en aquellos pacientes con artritis reumatoide con un DAS28(VSG) más alto, es decir, aquellos en una fase de la enfermedad más activa (Fig. 4).

Cuando se realizan los mismos análisis estadísticos para el grupo de pacientes con lupus eritematoso sistémico se observó que existía una correlación estadísticamente significativa entre la fosforilación de la Tyr323 de p38 de los linfocitos T de estos pacientes y la velocidad de sedimentación globular ($p < 0,05$) y entre la fosforilación de este residuo y la evaluación global del paciente ($p < 0,001$). Ambos marcadores indican una mayor actividad de la enfermedad (Figura 5).

En definitiva, la generación de este anticuerpo fosfoespecífico y su uso por citometría de flujo permite identificar que la fosforilación de la Tyr323 de p38 en células T es un proceso característico en ciertas enfermedades autoinmunes (incluidas artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico humano). Adicionalmente, la cuantificación del grado de fosforilación de la Tyr323 mediante citometría ha permitido identificar que existe una correlación estadísticamente significativa entre el grado de actividad en pacientes con artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico y el valor de la intensidad media de fluorescencia (FMI) de la Tyr323 de p38. Se puede concluir que la fosforilación específica en el residuo de Tyr323 de p38 es un marcador de actividad de autoinmunidad. Por último, esta invención no sólo aporta un posible y necesario marcador de diagnóstico en este tipo de enfermedades sino que permite su utilización rutinaria en hospitales ya que la citometría de flujo es una técnica usada diariamente.

Finalmente, la observación que la gravedad de estas enfermedades autoinmunes está relacionada con los niveles de expresión de la forma fosforilada Y323 de la proteína p38 - a mayores niveles de expresión mayor gravedad de la enfermedad - nos permite la identificación de un papel etiopatogénico de esta forma fosforilada en estas enfermedades, constituyéndose de esa manera en una diana terapéutica lo que permitiría el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas de estas enfermedades. Incluso el anticuerpo de la invención podría utilizarse en la elaboración de medicamentos para el tratamiento de estas enfermedades, e incluso como herramienta biotecnológica a la hora de identificar compuestos inhibidores de esta forma fosforilada de p38 que podrían convertirse así en nuevos principios activos contra estas enfermedades.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención lo constituye un procedimiento de diagnóstico y pronóstico de una enfermedad autoinmune, en adelante procedimiento de diagnóstico de la invención, basado en la determinación *in vitro* del nivel de fosforilación de la quinasa p38 en el residuo tirosina Y323 en células del sistema inmune, en una muestra biológica y que comprende las siguientes etapas:

a) identificación o determinación del nivel de fosforilación de la quinasa p38 en el residuo tirosina Y323, en una muestra biológica, preferentemente sangre y con células del sistema inmune,

b) comparación de dicha determinación observada en a) con una muestra biológica control, y

c) diagnóstico y/o pronóstico de una enfermedad autoinmune cuando los niveles fosforilación superan a los obtenidos en la muestra control.

Esta identificación de nivel de fosforilación de la proteína p38 en el residuo tirosina Y323 en una muestra biológica de un sujeto humano puede ser extraída del mismo y posteriormente *ex vivo* identificarse sobre la misma la presencia o no dicha fosforilación, que se correlacionaría con el diagnóstico de una enfermedad autoinmune en dicho sujeto, lo que permitiría la definición y la ejecución de una aproximación terapéutica o de diagnóstico y/o pronóstico. Igualmente, este procedimiento permitiría evaluar la eficacia o no de un determinado tratamiento en un paciente valorando la recuperación o no de niveles normales de esta forma fosforilada Y323 de p38.

La determinación de dichos niveles de dicha muestra biológica se lleva a cabo, preferentemente, en linfocitos T, los cuales pueden ser purificados o no previamente a su análisis, aunque preferentemente se purifican previamente. Dicha purificación puede llevarse a cabo fácilmente por un experto en la materia.

Un aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de diagnóstico de la invención donde la determinación de a) se realiza con un anticuerpo específico de la tirosina fosforilada (pY323) de la quinasa p38, más preferentemente, un anticuerpo policlonal, y más preferentemente, con un anticuerpo policlonal específico del péptido sintético de SEQ ID NO1, como el anticuerpo anti pY323 (anti-pTyr323) desarrollado en la presente invención (ver Ejemplos).

ES 2 324 083 A1

Un aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de diagnóstico de la invención donde la determinación de a) se realiza mediante una técnica capaz de detectar un anticuerpo perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, la siguiente grupo: citometría de flujo, Western blot, Dot blot, inmunoprecipitación, ELISA, ensayo inmunoquímico, dispositivo tipo biochip o microarray, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, microscopía confocal, microscopía de fluorescencia y Delfia.

Un aspecto más particular de la invención lo constituye el procedimiento de diagnóstico de la invención donde la determinación de a) se realiza mediante citometría de flujo donde se seleccionan linfocitos T de la muestra biológica, preferentemente sangre.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que la enfermedad autoinmune que se diagnostica pertenece al siguiente grupo: lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que la enfermedad autoinmune que se diagnostica en c) se lleva a cabo por la identificación de unos niveles similares a los obtenidos en el grupo control y que pertenece al siguiente grupo: espondilitis anquilosante. Hay que tener en cuenta que un resultado negativo en una prueba diagnóstica puede ser extremadamente útil con otros marcadores para realizar un diagnóstico diferencial de distintas enfermedades.

Otro aspecto de la invención lo constituye un anticuerpo útil para el diagnóstico y diferenciación, pronóstico y seguimiento de enfermedades autoinmunes, en adelante anticuerpo de la invención, que comprende un anticuerpo de isotipo IgG específico del aminoácido Tyr323 fosforilado de la quinasa p38 α .

Tal como se utiliza en la presente invención el término “anticuerpo de isotipo IgG específico del aminoácido Tyr323 fosforilado de la quinasa p38 α ” se refiere a un anticuerpo funcionalmente activo que es capaz de reconocer la proteína quinasa p38 fosforilada específicamente en su tirosina Y323, y que no presenta reactividad con la proteína no fosforilada o con formas fosforiladas de la misma distintas de la Y323.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “anticuerpo funcionalmente activo” se refiere a un anticuerpo recombinante o minianticuerpo que mantiene su capacidad de unión a antígeno, que se define como fragmentos derivados de anticuerpos construidos por tecnología de ADN recombinante, que, pese a su menor tamaño, conservan la capacidad de unión al antígeno ya que mantienen al menos un dominio variable de inmunoglobulina donde residen las zonas de unión a antígenos, y que pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: Fab, F(ab')₂, scFv, y anticuerpos recombinantes monodominio (dAbs). En el marco de la presente invención, se entiende por anticuerpos recombinantes monodominio y/o dominios tipo inmunoglobulina con capacidad de unión y reconocimiento independiente, tanto a los dominios variables de cadena pesada (VH), a los dominios variables de cadena ligera (VL), a los anticuerpos recombinantes de camelidos (VHH), los anticuerpos recombinantes de camelidos humanizados, los anticuerpos recombinantes de otras especies camelizadas, los anticuerpos monodominio IgNAR de peces cartilaginosos; es decir, que se incluyen tanto dominios que de forma natural son monodominio (caso de VHH e IgNAR), como anticuerpos que por ingeniería se han alterado para que por sí solos sean capaces de interaccionar con el antígeno y mejorar sus propiedades de estabilidad y solubilidad. Se incluye en esta definición cualquier modificación de los anticuerpos recombinantes como su multimerización o la fusión a cualquier molécula (p.ej. toxinas, enzimas, antígenos, otros fragmentos de anticuerpos, etc.).

El anticuerpo funcionalmente activo puede ser obtenido de un ser humano o un animal (p.ej. camellos, llamas, vicuñas, ratones, ratas, conejos, caballos, tiburones nodriza, etc.) o mediante técnicas de DNA recombinante o síntesis química de genes.

Así, un aspecto particular lo constituye un anticuerpo de la invención, ya sea monoclonal o policlonal, específico del péptido sintético de p38 α (VADPpYDQSFE) (SEQ ID NO1), y más preferentemente un anticuerpo policlonal específico del péptido sintético de p38 α (VADPpYDQSFE) (SEQ ID NO1).

Otro aspecto de la invención lo constituye el procedimiento de obtención del anticuerpo de la invención, en adelante procedimiento de la invención, basado en la generación del anticuerpo de la invención, preferentemente un anticuerpo policlonal, que comprende las siguientes etapas:

i) inmunización del animal mediante un péptido que contenga una tirosina fosforilada (Tyr323) representativa de la Tyr323 fosforilada de la proteína p38, preferentemente con el péptido VADPpYDQSFE ((319-328)-C(pY323), SEQ ID NO1),

ii) una etapa de purificación de los anticuerpos de isotipo IgG,

iii) una etapa de purificación de los anticuerpos que reconocen el péptido VADPpYDQSFE ((319-328)-C(pY323) fosforilado, por ejemplo, la IgG se pasa a través de una columna tiopropilsefárica 6B acoplada con el péptido p38 α (319-328)C(323pY), y opcionalmente

iv) preparación del anticuerpo de la invención para posteriores estudios.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que el antígeno utilizado para inmunizar el animal de i) es el péptido VADPPYDQSFE ((319-328)-C(pY323), SEQ ID NO1). Este péptido es representativo de la región del aminoácido Y323, es decir, comprende una serie de aminoácidos alrededor de dicho Y323 que permite la obtención de anticuerpos específicos, no de una tirosina fosforilada, sino de la p38 fosforilada en dicha Y323. De igual manera, un experto en la materia puede desarrollar fácilmente similares anticuerpos al de la presente invención a partir de péptidos o fragmentos de la p38 que comprendan este péptido de SED ID NO1, los cuales forman parte de la presente invención.

Finalmente, otro aspecto de la invención lo constituye el uso del anticuerpo de la invención en el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento, en adelante uso del anticuerpo de la invención, *in vitro* de enfermedades, desórdenes o patologías que cursan con alteración de la quinasa p38.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el uso del anticuerpo de la invención donde la enfermedad, desorden o patología es de origen autoinmune perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: Artritis reumatoide juvenil, Osteoartritis, Artritis psoriática, Esclerosis múltiple, *Miastenia gravis*, Lupus eritematoso sistémico, Lupus eritematoso cutáneo, Diabetes mellitas, Nefritis autoinmune o lúpica, Síndrome GoodPateur, Enfermedad de Addison autoinmune, Tiroiditis autoinmune, Dermatitis atópica, Dermatitis eczematosas, Psoriasis, Pénfigo, Síndrome Sjögren, *Alopecia areata*, Respuesta alérgica debida a infección por picadura de artrópodos, Enfermedad inflamatoria intestinal (Enfermedad de Crohn y Colitis ulcerosa), Enfermedad celiaca, Úlcera aftosa, Iritis, Conjuntivitis, Queratoconjuntivitis, Asma, Asma alérgico, Escleroderma, Tiroiditis, Vaginitis, Prostatitis, Erupción por drogas, Reacciones de inversión en la lepra, Eritema nodoso leproso, Uveítis autoinmune (anterior, intermedia y posterior), Encefalomiелitis alérgica, Encefalomiелitis autoinmune, Fiebre reumática, Encefalopatía hemorrágica aguda necrotizante, Pérdida del oído sensorial progresiva bilateral idiopática, Gingivitis, Anemia aplásica, Aplasia pura de células rojas, Trombocitopenia idiopática, Policondritis, Granulomatosis de Wegener, Hepatitis crónica activa, Síndrome de Stevens-Johnson, Esprue idiopático, Manifestaciones cutáneas del liquen plano, Oftalmopatía de Graves, Sarcoidosis, Cirrosis biliar primaria, Fibrosis pulmonar intersticial, Pancreatitis Linfoplasmocitaria Esclerosante y Pancreatitis aguda.

Por otro lado, la isoforma p38 α tiene la función más importante en señalización de las células T y está descrita como la isoforma más relevante en supresión tumoral. Así, otro aspecto particular de la invención lo constituye el uso del anticuerpo de la invención donde la enfermedad, desorden o patología es de origen tumoral.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el uso del anticuerpo de la invención donde la enfermedad, desorden o patología es de origen inflamatorio (es decir, con activación del sistema inmune) perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: enfermedad de injerto contra huésped en trasplantes e infecciones virales.

Además, el anticuerpo de la invención puede ser utilizado, además del anterior uso como herramienta de diagnóstico, en otros procedimientos biotecnológicos de identificación de la proteína p38 fosforilada en la Y323 pertenecientes, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo:

i) procedimiento de identificación de compuestos que alteran, preferentemente inhibidores, la actividad de la proteína p38 mediada por dicha Y323 fosforilada, o en un

ii) procedimiento de elaboración de una composición terapéutica útil para el tratamiento de enfermedades que cursen con una alteración de la expresión de esta forma fosforilada Y323 de p38.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “compuesto inhibidor” se refiere a una molécula que cuando se une o interactúa con la proteína p38 fosforilada en Y323, o con fragmentos funcionales de la misma, disminuye o elimina la intensidad o la duración de la actividad biológica de dicha proteína.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o un medicamento útil para el tratamiento de enfermedades que cursen con alteración de la proteína p38 fosforilada en Y323, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto inhibidor de dicha proteína, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto inhibidor es un anticuerpo específico de la proteína p38 fosforilada en Y323, ya sea monoclonal o policlonal, preferentemente un anticuerpo policlonal específico del péptido de secuencia SEQ ID NO1.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del compuesto inhibidor de la actividad de la proteína p38 fosforilada en Y323, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, in-

cluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

5 En una realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por vía oral, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en Faulí i Trillo, 1993.

15 Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un método de tratamiento de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una enfermedad que cursa con alteración de la expresión de la proteína p38 fosforilada en Y323, en adelante uso de la composición farmacéutica de la presente invención, consistente en la administración de dicha composición terapéutica que inhibe la actividad de dicha proteína.

20 Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en el que la enfermedad pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: enfermedades autoinmunes -preferentemente, lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide-, alérgicas, inflamatorias, alteraciones linfoproliferativas como leucemias y cánceres.

25 Descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra la generación y caracterización de un anticuerpo fosfoespecífico del residuo de Y323 de p38 para estudiar la vía alternativa de p38 por citometría de flujo y western blot. Para ello se obtiene un antisuero usando un péptido sintético de p38 α (VADPpYDQSFE) basado en la secuencia humana de p38 α que contiene la Y323 fosforilada. La especificidad del anticuerpo fue confirmada por ELISA (Figura 1A) y dot blot (Figura 1B) utilizando los péptidos sintéticos fosforilado y no fosforilado de p38 α humano (VADPpYDQSFE). La Figura 1C describe la optimización del estudio intracelular de la fosforilación de Y323p38 por citometría de flujo. Los histogramas de FACS muestran un experimento representativo en el cual las células Jurkat se estimulan con α CD3 y α CD28. Las células se fijan con formaldehído y se permeabilizan con saponina o Tritón X-100, previo al uso del anticuerpo anti pY323p38. Las células sin estimular son representadas por los histogramas rellenos y las muestras estimuladas vía TCR por los histogramas sin rellenar. La Figura 1D muestra el análisis por citometría de flujo de la fosforilación en el residuo de T180/Y182 de p38 después de la activación vía TCR. Las células Jurkat se estimulan con α CD3 y α CD28. En este caso, las células se permeabilizan con metanol previo al uso del anticuerpo fosfoespecífico. La Figura 1E muestra el análisis por western-blot de la fosforilación de p38 vía TCR/CD28 (en Y323 y en T180/Y182) en células Jurkat. Los resultados son representativos de experimentos independientes.

40 La Figura 2 muestra que la fosforilación de p38 en la Y323 y en T180/Y182 tras activación por TCR/CD28 es dependiente de Lck y ZAP70. En la Figura 2A las células Jurkat y JCaM1 (células Jurkat deficientes en Lck) se tratan con PP2 (un inhibidor de Lck) durante 1 hora antes de la activación con α CD3, α CD28 ó α CD3+ α CD28. La fosforilación de p38 (en Y323 y en T180/T182) y la expresión total de p38 se analiza por inmunoblot. En Figura 2B se muestran los niveles de fosforilación de p38 mediante citometría de flujo tras activación vía TCR. Las células Jurkat y las deficientes en Lck se estimulan con α CD3, α CD28 o α CD3+ α CD28 (10 minutos, 37°C). Las células se fijan con formaldehído y se permeabilizan con saponina (pY323p38) o metanol (p(T180+Y182)p38). Los histogramas muestran la fosforilación de p38 en sus diferentes residuos tras activación vía TCR y TCR/CD28 en células Jurkat, esta fosforilación no se aprecia en células Lck $^{-/-}$. La Figura 2C muestra que cuando las células Jurkat se tratan con α CD3 o α CD3+ α CD28, los extractos celulares se inmunoprecipitan con anti-p38 y se realiza un análisis de actividad quinasa (IVK) utilizando ATF-2 como sustrato. La fosforilación de ATF-2 se analiza por western-blot. La Figura 2D ilustra el análisis de las vías alternativa y clásica de MAPK después de la activación vía TCR. Las células Zap70 $^{-/-}$ (células Jurkat deficientes en Zap70, p116) y Zap70 $^{+/+}$ (células p116 transfectadas con la proteína Zap70, p116.c139) se activan con α CD3, α CD28 o α CD3+ α CD28. La fosforilación de Y323p38, (T180/Y182)p38, MKK3, MKK6 y la expresión total de p38 se determina por inmunoblot. Los resultados demuestran que la fosforilación de p38 en ambos residuos, tras estimulación vía TCR y TCR/CD28, es dependiente de Zap70. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

60 La Figura 3 ilustra el análisis de la fosforilación del residuo de Y323 de p38, mediante citometría de flujo en controles sanos y pacientes con enfermedades autoinmunes. Se analiza la intensidad de fluorescencia (MFI) de Y323p38 en células T purificadas de sangre de controles sanos y pacientes con diferentes enfermedades autoinmunes (espondilitis anquilosante, lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide). En el diagrama de cajas se muestran los percentiles (p25, p50 (mediana) y p75), la desviación estándar y los valores atípicos. La comparación estadística fue realizada con el test de Kruskal-Wallis. Las diferencias de fosforilación en el residuo de Y323 de p38 de pacientes con artritis reumatoide y con lupus eritematoso sistémico con respecto al grupo con espondilitis anquilosante y los controles sanos son estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

La Figura 4 muestra el análisis de la fosforilación de p38 en células T de pacientes con artritis reumatoide. La Figura 4A ilustra la intensidad de fluorescencia (MFI) de la fosforilación en el residuo de Y323 respecto a la fosforilación en el residuo de T180/Y182 de p38 obtenidos por citometría de flujo de pacientes con artritis reumatoide. Se representa la significación estadística obtenida utilizando el modelo lineal generalizado ($p < 0,05$). La Figura 4B muestra la intensidad de fluorescencia (MFI) de la fosforilación en el residuo de Y323 de p38 obtenida por citometría de flujo y el valor del índice clínico de actividad de artritis reumatoide conocido como DAS28 (Disease Activity Score) obtenido mediante la velocidad de sedimentación globular (VSG) de pacientes con artritis reumatoide. La Figura 4C muestra los histogramas de intensidad de fluorescencia (MFI) de la fosforilación del residuo de Y323 de p38 de un grupo representativo de controles sanos y de un grupo representativo de pacientes con artritis reumatoide divididos en categorías según su valor de DAS28(VSG). Los histogramas de los controles se representan en gris relleno y los de los pacientes en una gradación de azules sin relleno según el valor de DAS28(VSG). Existe una relación significativa (según el modelo lineal generalizado ($p < 0,05$)) entre la fosforilación en el residuo de Y323 de p38 y la actividad de la enfermedad medido mediante el DAS28(VSG) en los pacientes con artritis reumatoide, de modo que los pacientes con mayor actividad de AR tienen mayor fosforilación de Y323.

La Figura 5 ilustra el análisis estadístico de la fosforilación de p38 en lupus eritematoso sistémico. La Figura 5A muestra la intensidad de fluorescencia (MFI) de la fosforilación en el residuo de Y323 y en el de T180/Y182 de p38 obtenidos por citometría de flujo de pacientes con lupus eritematoso sistémico. Se representa la significación estadística obtenida utilizando el modelo lineal generalizado ($p < 0,05$). La Figura 5B muestra la intensidad de fluorescencia (MFI) de la fosforilación en el residuo de Y323 de p38 obtenido por citometría de flujo y la velocidad de sedimentación globular (VSG) de pacientes con lupus eritematoso sistémico. Existe una relación significativa (según el modelo lineal generalizado, $p < 0,05$) entre la fosforilación en el residuo de Y323 de p38 y la velocidad de sedimentación globular (VSG), de modo que a mayor VSG mayor fosforilación o viceversa. La Figura 5C representa la intensidad de fluorescencia (MFI) de la fosforilación en el residuo de Y323 de p38 y la evaluación global de pacientes (VGEPAC) con lupus eritematoso sistémico. Existe una relación significativa (según el modelo lineal generalizado, $p < 0,001$) entre la fosforilación en el residuo de Y323 de p38 y la evaluación global de pacientes (VGEPAC) con lupus eritematoso sistémico, de tal manera que a mayor VGEPAC mayor fosforilación o viceversa.

La Figura 6 ilustra los histogramas del valor de intensidad de fluorescencia (MFI) de la fosforilación del residuo de Y323 (Figura 6A) y del residuo de T180/Y182 (Figura 6B) de p38 de un grupo representativo de controles sanos y de un grupo representativo de pacientes con lupus eritematoso sistémico. Los histogramas de los controles se representan en gris relleno y los de los pacientes en negro con diferentes perfiles.

Ejemplo de realización de la invención

Ejemplo 1

Generación y caracterización del anticuerpo fosfoespecífico frente a la Tyr323 de p38 para estudiar la relevancia de la vía alternativa de p38 por citometría de flujo

Recientemente, se ha demostrado que la quinasa p38 tiene una vía alternativa de activación en células T mediada por la tirosina quinasa Zap70 que fosforila p38 en el residuo de Y323, conduciendo a su activación, por un mecanismo independiente de la vía clásica de MAPKKs18. Para analizar el papel de la vía alternativa de p38 se generó un anticuerpo fosfoespecífico del residuo de Y323 de p38. Así, se obtuvo un antisuero usando un péptido sintético de p38 α (VADPpYDQSFE, ver SEQ ID NO1) basado en la secuencia humana de p38 α (319-328)-C(pY323) que contiene la Y323 fosforilada. La especificidad del anticuerpo fue confirmada por ELISA y dot blot utilizando los péptidos sintéticos de p38 α (Figura 1A y 1B). Con el objetivo de analizar la fosforilación de la Y323 en diferentes poblaciones de linfocitos T de modelos murinos y de pacientes humanos, se optimizó la utilización del anticuerpo por citometría de flujo. El análisis por citometría de flujo de fosfoproteínas tiene numerosas ventajas frente a otras técnicas convencionales como western blot, ya que permite la cuantificación del grado de fosforilación a partir de un número muy inferior de células y sin necesidad de purificar la población que se quiere monitorizar. Los parámetros más críticos para la detección de fosfo-epítomos de proteínas intracelulares, mediante citometría de flujo, son las técnicas de fijación y permeabilización celular. Para optimizar la cuantificación de la fosforilación de p38 en el residuo de Y323, se probaron diferentes protocolos de fijación y permeabilización utilizando distintos reactivos incluyendo el metanol (no mostrado), la saponina y el Tritón X-100 (Figura 1C) ¹⁹⁻²². De todos los métodos analizados, la fijación con formaldehído y permeabilización con saponina al 0,1% resultó el método más eficaz para monitorizar la fosforilación del residuo de Y323 de p38 tras activación de las células Jurkat vía coestimulación TCR/CD28. La optimización de este protocolo fue crítica para analizar la fosforilación de p38 en células de pacientes humanos como se verá posteriormente en los ejemplos 3 y 4. Adicionalmente, se optimizó el método para el análisis de la fosforilación de p38 en el residuo de T180/Y182 (Figura 1D). La coestimulación vía TCR/CD28 aumenta la fosforilación de p38 en T180/182 pero en este caso, el metanol es mejor reactivo para la permeabilización. El análisis por citometría de flujo tras estimulación vía TCR/CD28 que induce la fosforilación de los residuos de Y323 y T180-Y182 de p38 se correlaciona claramente con los resultados del inmunoblot (Figura 1E, Figura 2A, 2B) tanto para células Jurkat como para células T de ratón.

Ejemplo 2

La fosforilación de p38 en la Y323 es dependiente de la activación por el receptor de antígeno de la célula T (TCR)

5 Para determinar la contribución de la vía alternativa tras estimulación vía TCR, se analizó la fosforilación en el residuo de Y323 y de T180/Y182 de p38 después de la activación de células Jurkat con anti-CD3 (α CD3), anti-CD28 (α CD28) o coestimulación con α CD3 + α CD28 (Figura 2). Los resultados obtenidos mediante western-blot se confirmaron por citometría de flujo (Figura 2B). La activación con α CD28 no aumentó la fosforilación de p38 ni en el residuo de Y323 ni en el dual (T180-Y182). Los análisis de citometría de flujo y de western-blot demuestran que
10 la coestimulación TCR/CD28 induce un aumento sustancial de la fosforilación del residuo T180-Y182, pero no del residuo de Y323, comparado con las células activadas sólo con α CD3 (Figura 2A, B). La fosforilación del residuo de Y323 de p38 es así regulada específicamente por el receptor de antígeno de la célula T, pero no por la coestimulación con α CD28.

15 La familia de quinasas Src (especialmente Lck) y Zap70 son las únicas quinasas, actualmente identificadas, que fosforilan el residuo de Y323 de p38 en células T por la vía alternativa. Se estudió el efecto de PP2, un inhibidor de la quinasa Lck, en la activación de p38 mediada por la activación vía TCR/CD28. PP2 suprimió la fosforilación de p38 en el residuo Y323 y en el T180/Y182 en células Jurkat tras estimulación vía TCR y TCR/CD28 (Figura 2A), sugiriendo que Lck es necesario para la fosforilación en ambos residuos. Para confirmar la importancia *in vivo*
20 de Lck, se realizó el mismo estudio con células Jurkat deficientes en Lck (JCaM1). El inmunoblot y el análisis por citometría de flujo demuestran que en las células deficientes de Lck la activación vía TCR o TCR/CD28 no aumenta la fosforilación de p38 ni en el residuo de Y323 ni en el residuo T180- Y182 (Figura 2A y B). Estos resultados indicaron que la fosforilación de p38, en ambos residuos, vía TCR y TCR/CD28 requiere Lck.

25 Para analizar si el aumento de fosforilación de p38 se correlacionaba con un aumento en su actividad se analiza la actividad de p38 después de la activación vía TCR, usando ATF-2 como sustrato (Figura 2C). La fosforilación de ATF-2 en las células Jurkat por p38 tras estimulación vía TCR fue clara. La coestimulación vía TCR/CD28 dio lugar a un aumento notable de la fosforilación de ATF-2 comparado con las células activadas sólo por vía TCR. Estos resultados demuestran que la vía alternativa regula específicamente la activación de p38 después del estímulo vía TCR.
30 La coestimulación vía TCR/CD28 activa p38 por la vía alternativa, pero también da lugar a una activación leve de la cascada clásica de MAPK. Para determinar si Zap70 tiene un papel *in vivo* en la regulación de la activación de p38, se utilizaron células jurkat T deficientes en Zap70 (Figura 2D). El inmunoblot demostró que ni la estimulación vía TCR ni la estimulación vía TCR/CD28 inducen la fosforilación de p38 en sus residuos de Y323 y T180-Y182 en las células Zap70^{-/-}. La reconstitución de las células de Zap70^{-/-} con la proteína Zap70 (Zap70^{+/+}) restauró la capacidad
35 de fosforilar p38 en ambos residuos después de la activación del TCR. Semejante a lo que ocurría en las células Jurkat, la coestimulación vía TCR/CD28 de las células Zap70^{+/+} indujo una mayor fosforilación de p38 en el residuo T180-Y182 comparada con la activación vía TCR solamente (Figura 2D). También se evaluó la vía clásica tras activación vía TCR y vía TCR/CD28 en células Zap70^{-/-}. La activación vía TCR, CD28 o TCR/CD28 en células Zap70^{-/-} no indujo la fosforilación de las quinasas activadoras de p38, MKK3, MKK6 (Figura 2D) o MKK4 (no demostrado). La reconstitución de las células de Zap70^{-/-} con la proteína Zap70 (Zap70^{+/+}) provocó un aumento leve en la activación
40 de MKK3 y de MKK6 vía TCR/CD28 (Figura 2D). La activación sólo por la vía TCR no activa MKK3, MKK6 o MKK4. Los resultados indicaron que Zap70 tiene una función dominante en la regulación de la activación de p38 dependiente de TCR, es decir, por la vía alternativa.

45 Ejemplo 3

Monitorización de la fosforilación de la Tyr323 de p38 y de la Thr180-Tyr182 en células T de pacientes con enfermedades autoinmunes

50 Los resultados apoyan que la fosforilación del residuo de Y323 de p38 es específica de la activación por el receptor de antígeno de la célula T (TCR). Basándose en este hecho y en el papel clave de p38 en procesos inflamatorios y autoinmunes, se propuso el estudio de la fosforilación de la Y323 de p38 en células T de individuos con enfermedades autoinmunes donde la hiperactivación de las células T es una de las características claves en la sintomatología de la enfermedad. Adicionalmente, los ratones deficientes en Gadd45a, un regulador negativo de la vía alternativa de
55 p38, tienen hiperproliferación de células T, hiperfosforilación de p38 y desarrollan espontáneamente un síndrome similar a lupus eritematoso sistémico²⁵. Con todos estos datos se propuso el estudio de la fosforilación de p38 en ambos residuos por citometría de flujo en un grupo de individuos con lupus eritematoso sistémico y otro grupo con artritis reumatoide. Como controles se utilizaron un grupo de individuos que no padecen enfermedades autoinmunes y un grupo de individuos con espondilitis anquilosante. La citometría de flujo permitió realizar el estudio en un
60 grupo amplio de la población con el que poder realizar análisis estadísticos robustos. La fosforilación del residuo de Y323 de p38 fue significativamente superior ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis) en los linfocitos T de los individuos con lupus eritematoso sistémico y con artritis reumatoide a la fosforilación de la Y323 de p38 de los linfocitos T de los individuos con espondilitis anquilosante y del grupo de controles sanos como se muestra en el diagrama de cajas (Figura 3). Esto indicaría que la fosforilación de este residuo sería un buen marcador de este tipo de enfermedades autoinmunes.

65 Atendiendo a los datos clínicos de los diferentes grupos de pacientes y a los valores obtenidos por citometría de flujo para la fosforilación de p38 en linfocitos T, se realizó un análisis estadístico utilizando el modelo lineal generalizado. Se obtuvo una correlación estadísticamente significativa entre la fosforilación de la Y323 y la fosforilación

ES 2 324 083 A1

de T180/Y182 de linfocitos T de un grupo de pacientes con artritis reumatoide ($p < 0,05$, Figura 4A) y de un grupo de pacientes con lupus eritematoso sistémico ($p < 0,05$, Figura 5A). Esto confirma el mecanismo de autofosforilación en el residuo de T180/Y182 tras la fosforilación de la Y323 vía TCR.

5 En artritis reumatoide se observa una correlación entre la fosforilación del residuo de Y323 de linfocitos T y el DAS28(VSG) ($p < 0,05$, Figura 4B). El DAS28(VSG) es un índice clínico que mide actividad de la enfermedad y se obtiene teniendo en cuenta la velocidad de sedimentación globular (VSG) y la evaluación global del paciente²³⁻²⁴. La fosforilación en la Y323 de p38 es mayor en aquellos pacientes con artritis reumatoide con un DAS28(VSG) más alto, es decir, aquellos en una fase de la enfermedad más activa. En la Figura 4C se muestran los histogramas de fosforilación de la Y323 de p38 de los linfocitos T de un grupo representativo de controles sanos (gris relleno) y de un grupo representativo de pacientes con artritis reumatoide subdividido a su vez según el valor de DAS28(VSG) en el momento del estudio (gradación de azules sin relleno según el valor de DAS28). Se observa la correlación entre el grupo de pacientes con mayor DAS28(VSG) y la mayor fosforilación de la Y323 de p38.

15 Cuando se realizan los mismos análisis estadísticos para el grupo de pacientes con lupus eritematoso sistémico se observa que existe una correlación estadísticamente significativa entre la fosforilación de la Y323 de p38 de los linfocitos T de estos pacientes y la velocidad de sedimentación globular (VSG) ($p < 0,05$, Figura 4B) y entre la fosforilación de este residuo y la evaluación global del paciente ($p < 0,001$, Figura 4C). Ambos marcadores indican una mayor actividad de la enfermedad. En la figura 5 se muestran los histogramas de la fosforilación de la Y323 (A) y de T180/Y182 (B) de p38 de los linfocitos T de un grupo representativo de controles sanos (gris con relleno) y de un grupo representativo de pacientes con lupus eritematoso sistémico (negro sin relleno). En esta figura se muestra como la fosforilación en p38 (tanto en el residuo de Y323 como en el residuo de T180/Y182) es mayor en los linfocitos T de pacientes con lupus eritematoso sistémico que en los linfocitos T del grupo de controles sanos. Por otro lado, se muestra que la fosforilación en el residuo de T180/Y182 es más homogéneo entre los diferentes individuos que la fosforilación en el residuo de Y323, esto indicaría la correlación entre la fosforilación en la Y323 y las características clínicas particulares de cada paciente.

Con todos estos resultados se puede concluir que la fosforilación de la Y323 de p38 es un marcador de actividad de artritis reumatoide y de lupus eritematoso sistémico.

Materiales y Métodos

Líneas celulares

35 Jurkat (clon E6-1), JCam (JCaM1.6), derivada del clon E6-1 de la línea celular Jurkat, pero deficiente en la actividad de Lck por pérdida del exon 7 de su mRNA, p116 derivada del clon E6-1 de la línea celular Jurkat deficiente en Zap70 y p116.c139 que procede de transfectar el vector de expresión de Zap70 en la línea p116. p116 y p116.c139 fueron obtenidas de la ATCC (American Type Culture Collection).

40 Los cultivos celulares fueron mantenidos entre $5-10 \times 10^4$ células/ml con RPMI-1640 (Gibco BRL), 10% de FCS, 1% de penicilina-estreptomicina, b-Mercaptoetanol y 1% de L-glutamina

Muestras humanas

45 Se recibieron entre 10-20 ml de sangre en tubos de heparina de pacientes con artritis reumatoide (118), lupus eritematoso sistémico (29), espondilitis anquilosante (33) y de controles sanos (30). La sangre se diluye 1:1 en PBS y se añade lentamente sobre Ficoll-Paque Plus (Amersham) (2 ml de sangre diluida por 1 ml de ficoll). Se centrifuga a 900 G 45 minutos a temperatura ambiente y sin freno. Tras la centrifugación, se recoge la interfase donde se encuentran las células mononucleares y se lava con PBS centrifugando a 300 G 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se pasa a la purificación por selección negativa de linfocitos T utilizando el kit de Dynal (Invitrogen). Brevemente, se añaden 20 μ l de la mezcla de anticuerpos por cada 10×10^6 células y se incuban 20 minutos a 4°C. Tras lavar con PBS + 0,1% BSA + 2 mM EDTA se incuban las células con bolas magnéticas conjugadas con anticuerpos anti-IgG de ratón (100 ml de bolas magnéticas por cada 10×10^6 células) durante 15 minutos a temperatura ambiente y con agitación. Finalmente, se emplaza el tubo en un imán durante 2 minutos y se recoge el sobrenadante que contendrá las células T aisladas por selección negativa.

Las células T purificadas se resuspenden a una concentración de $0,5 \times 10^6$ en medio RPMI-1640, 10% de FCS, 1% de penicilina-estreptomicina, b-Mercaptoetanol y 1% de L-glutamina y se dejan O/N a 37°C, 5% CO₂ y 99% de humedad relativa.

Ratones

Se purificaron células T de bazo y nódulos linfáticos de ratón mediante cromatografía de afinidad por selección negativa como se describe en Salvador *et al.*, Immunity 2002. Las células T purificadas se resuspenden a una concentración de $0,5 \times 10^6$ en medio RPMI-1640, 2% de FCS, 1% de penicilina-estreptomicina, b-Mercaptoetanol y 1% de L-glutamina y se incuban O/N a 37°C, 5% CO₂ y 99% de humedad relativa.

ES 2 324 083 A1

Anticuerpos

El procedimiento para la obtención del anticuerpo policlonal frente al residuo fosforilado de Y323 de p38 es el siguiente: Los péptidos se sintetizan en un sintetizador de péptidos múltiple automatizado (Multipep, Intavis AG) usando el procedimiento de fase sólida y los grupos de protección estándares de las cadenas laterales de la química de Fmoc: OtBu (D, E), Trt (Q, C), tBu (s), Bzl (pY). Las cadenas del péptido se elongan en una resina de Wang cargada con cisteína, los acopladores se realizan con HBTU/NMM. Las resinas terminadas de los péptidos se tratan con TFA/H₂O/EDT/TIS (94.5/2.5/2.5/1 v/v) a 20°C durante 120 minutos. Después de la precipitación con terc-butilmetil éter, los péptidos crudos obtenidos se analizan por HPLC y se liofilizan. Los péptidos se purifican por cromatografía líquida de alta densidad (HPLC) en una columna Deltapak C18 (7,8 x 300 mm). La homogeneidad y la integridad del péptido se confirman por HPLC analítico, análisis aminoacídico (analizador de aminoácidos de Beckman 6300, tras hidrólisis del ácido en una atmósfera de N₂ durante 18 horas a 110°C) y espectrometría de masas (espectrómetro de masas Broker Reflex III). Los péptidos se unen a hemocianina (KLH, perforan, 77600T) por la cisteína del N-terminal usando un agente de ligación, sulfo-succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC). El cociente molar del péptido:transportador se estima por el análisis de aminoácidos del complejo relativo al análisis de aminoácidos de la proteína del transportador solamente después de hidrólisis de ácido.

El conejo se inmuniza con KLH-VADPpYDQSFEC y el antisuero se purifica con una columna de G sefarosa (Amersham, 17-0619-01), la IgG se pasa a través de tiopropilsefarosa 6B acoplada con p38 α (319-328)C(323pY) y el anticuerpo policlonal se une a sulfa-NHS-LC-biotina (Pierce 21335). Para el análisis por western-blot, anti-fosfop38 (T180/Y182), anti-MKK3, anti-fosfoMKK3/6 y anti-MKK3 fueron obtenidos de Cell signaling. Los anticuerpos secundarios marcados con HRP fueron obtenidos de Dako. Para el análisis por citometría de flujo, el anti-fosfop38 (T180/Y182) está conjugado con alexa 647 y se obtuvo de Pharmingen y la avidina conjugada con ficoeritrina de Southernbiotech.

Estudio de la fosforilación de p38

Western-blot

Las células se solubilizan con un tampón de lisis (1% Tritón X-100, 20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2,5 mM pirofosfato sódico, 1 mM b-Glicerofosfato, 1 mM Na₃VO₄, 1 mg/ml de leupeptina y 1 mM PMSF) y se centrifugan (20.800 G, 10 minutos a 4°C). Las proteínas se resuelven por SDS-PAGE (al 10%) y se transfieren a una membrana de Immobilon-P (Millipore Inc.). Para analizar las diferentes proteínas se usa el tampón Tris-HCl 62 mM (pH 6.8), 2% de SDS y 100 mM de b-mercaptoetanol. El revelado se realiza usando quimioluminiscencia (PerkinElmer).

Citometría de flujo

Tras el estímulo, las células se resuspenden en PBS (Roche) el + 1% de formaldehído (sigma) y se fijan durante 10 minutos a 37°C y 1 minuto en hielo. Las muestras humanas siguen este procedimiento tras estar O/N en el incubador.

Para usar el anticuerpo anti-fosfop38 (T180/Y182) (Pharmingen) la permeabilización se realiza con metanol frío al 100% (Merck), al pellet celular resuspendido en PBS frío se le añade lentamente y agitando el metanol para que la concentración final sea del 90% y se incuban 1 hora a -20°C. Las células se lavan y 5x10⁵ células se resuspenden en 90 ml PBS + 0.5% de BSA (sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Y entonces se incuban con 10 ml del anticuerpo fosfoespecífico del residuo T180/Y182 de p38 conjugado con alexa 647 durante 1 hora a temperatura ambiente. Para usar el anticuerpo policlonal que reconoce el residuo de Y323 fosforilado (generado en el CNB), 5x10⁵ se resuspenden en 50 ml de PBS + 0.5% BSA + 0.1% saponina (sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente y después se incuban con 1,5 mg del anticuerpo policlonal pY323p38 conjugado con biotina durante 1 hora a temperatura ambiente. Para el estudio de fosforilación del residuo de Y323 de p38, las células se incuban con el 30 ml de avidina conjugada con ficoeritrina (Southernbiotech) (1: 200 dilución) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavan con el PBS+0.5%BSA, más 0,1% de saponina en el caso del anticuerpo anti-pY323p38, y se analizan en un citómetro (FACSCalibur, Becton Dickinson). Un mínimo de 100.000 células se analiza por muestra, excluyendo las células no viables. Los resultados se analizan mediante el software Cytomics RXP.

Activación celular

3x10⁶ células/pocillo se depositan en placas de 24 pocillos y después de 60-90 minutos a 37°C, se estimulan durante 10 minutos (Jurkat y JCaM) y 5 minutos (p116 y p116.cl39) con α CD3 (0,5 ó 2 mg/ml), α CD28 (2 mg/ml) y α CD3 (0,5 mg/ml) + α CD28 (2 mg/ml) (Pharmingen) Para el análisis por citometría de flujo, previo a la estimulación, las células se incuban durante la noche en ausencia de suero.

En el caso de las células de ratón, 3x10⁶ células/pocillo se depositan en placas de 24 pocillos y después de 60-90 minutos a 37°C, se estimulan durante 30 minutos con α CD3 (0,5 ó 2 mg/ml), α CD28 (2 mg/ml) y α CD3 (0,5 mg/ml) + α CD28 (2 mg/ml) utilizando un anti-IgG como crosslinker del α CD3 (Pharmingen) y del α CD28 (Pharmingen).

Ensayo de actividad

Las células fueron solubilizadas en tampón de lisis. p38 fue inmunoprecipitado con anti-p38 a 30°C durante 20 minutos en un volumen de 50 ml del tampón (25 mM Tris, pH 7.5, 5 mM de β-glicerofosfato, 2 mM de ditioneitol, 0,1 mM Na₂VO₄ y 10 mM de MgCl₂) con 1 mg de proteína de fusión ATF-2 (Cell signaling) y 50 mM de ATP (Cell signaling). La fosforilación de ATF-2 se detecta por western-blot usando anti-ATF-2 (Cell signaling).

Análisis estadístico

Para el análisis de la población global de los datos de inmunofluorescencia obtenidos del estudio de fosforilación de p38 en sus diferentes residuos por citometría de flujo, de las muestras de las diferentes enfermedades se utilizó el test de Kruskal-Wallis. Para el análisis individualizado de la fosforilación de p38 por citometría en relación con los datos clínicos de cada enfermedad, se llevó a cabo un análisis multivariable utilizando el modelo lineal generalizado. Se asumieron diferencias significativas cuando se obtenía una significación <0,05.

Referencias bibliográficas

- 1.- **Ambrosino, C. and Nebreda, A. R. (2001) *Biol Cell* 93, 47-51.**
- 2.- **Crawley, J.B., Rawlinson, L., Lali, F. V., Page, T. H., Saklatvala, J. and Foxwell, B. M. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 15023-15027.**
- 3.- **Rincon, M., Enslin, H., Ringeaud, J., Recht, M., Zapton, T., Su, M. S., Penix, L. A., Davis, R. J. and Flavell, R. A. (1998) *EMBO J.* 17, 2817-2829.**
- 4.- **Merritt, C., Enslin, H., Diehl, N., Conze, D., Davis, R. J. and Rincon, M. (2000) *Mol. Cell Biol.* 20, 936-946.**
- 5.- **Rincon, M. and Pedraza-Alva, G. (2003) *Immunol. Rev.* 192, 131-1421.**
- 6.- **Dong, C., Davis, R. J. and Flavell, R.A. (2002) *Annu. Rev. Immunol.* 20, 55-72.**
- 7.- **Chang, L. and Karin, M. (2001) *Nature* 410, 37-40.**
- 8.- **Kato, Y., Kravchenko, V. V., Tapping, R. I., Han, J., Ulevitch, R. J. and Lee, J.D. (1997) *EMBO J.* 16, 7054-7066**
- 9.- **Davis, R. J. (2000) *Cell* 103, 239-252.**
- 10.- **Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L. and Ulevitch, R. J. (1994) *Science* 265, 808-811.**
- 11.- **Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D, Hunt, T. and Nebreda, A.R. (1994) *Cell* 78, 1027-1037.**
- 12.- **Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., Strickler, J. E., McLaughlin, M. M., Siemens, I. R., Fisher, S. M., Livi, G. P., White, J. R., Adams, J. L., and Young, P. R. (1994) *Nature* 372, 739-746.**
- 13.- **Freshney, N.W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J. and Saklatvala, J. (1994) *Cell* 78, 1039-1049.**
- 14.- **Dodeller F, Schulze-Koops H. (2006) *Arthr Res Ther* 8(2), 205.**
15. **Ashwell JD. (2006) *Nat Rev Immunol* 6, 532-40.**
- 16.- **Jiang, Y., Li, Z., Schwarz, E. M., Lin, A., Guan, K., Ulevitch, R. J. and Han, J. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 11096-11102.**
- 17.- **Bellon, S., Fitzgibbon, M. J., Fox, T., Hsiao, H. M. and Wilson, K. P. (1999) *Structure* 7, 1057-1065.**
- 18.- **Salvador, J. M., Mittelstadt, P. R., Guszczynski, T., Copeland, T. D., Yamaguchi, H., Appella, E., Fornace, Jr., A. J. and Ashwell, J. D. (2005) *Nat. Immunol.* 6, 390-395.**
- 19.- **Perez, O. D. and Nolan, G.P. (2002) *Nat. Biotechnol.* 20, 155-162.**
- 20.- **Krutzik, P.O., Irish, J. M., Nolan, G. P. and Perez, O. D. (2004) *Clin. Immunol.* 110, 206-221.**
- 21.- **Perez, O.D., Krutzik, P. O. and Nolan, G. P. (2004) *Methods Mol. Biol.* 263, 67-94.**

ES 2 324 083 A1

22.- **Krutzik**, P.O. and **Nolan**, G. P. (2003) *Cytometry A* 55, 61-70.

23.- Van der **Heijde** DM, van 't **Hof** M, van **Riel** PL, van de **Putte** LB. Development of a disease activity score based on judgment in clinical practice by rheumatologists. *J Rheumatol.* 1993 Mar; 20(3), 579-81.

5

24.- **Villaverde** V, **Balsa** A, **Cantalejo** M, **Fernández-Prada** M, **Madero** MR, **Muñoz-Fernández** S, **Gijón-Baños** J, **Martín-Mola** E. Activity indices in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2000 Nov; 27(11), 2576-81.

10

25.- **Salvador**, J.M., P.R. **Mittelstadt**, G.I. **Belova**, A.J. **Fornace**, Jr., and J.D. **Ashwell**. 2005. The autoimmune suppressor Gadd45alpha inhibits the T cell alternative p38 activation pathway. *Na.t Immunol.* 6, 396-402.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de diagnóstico y pronóstico de una enfermedad autoinmune **caracterizado** porque se basa en la determinación *in vitro* del nivel de fosforilación de la quinasa p38 en el residuo tirosina Y323 en células del sistema inmune y porque comprende las siguientes etapas:

a) identificación o determinación del nivel de fosforilación de la quinasa p38 en el residuo tirosina Y323, en una muestra biológica, preferentemente sangre y on células del sistema inmune, más preferentemente linfocitos T,

b) comparación de dicha determinación observada en a) con una muestra biológica control, y

c) diagnóstico y/o pronóstico de una enfermedad autoinmune cuando los niveles fosforilación superan a los obtenidos en la muestra control.

2. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la determinación de a) se realiza con un anticuerpo específico del péptido sintético de SEQ ID NO1, como el anticuerpo anti pY323, anti-pTyr323, específico de la Y323 fosforilada, desarrollado en la presente invención.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la determinación de a) se realiza mediante una técnica capaz de detectar un anticuerpo perteneciente al siguiente grupo: citometría de flujo, Western blot, Dot blot, inmunoprecipitación, ELISA, ensayo inmunoquímico, dispositivo tipo biochip o microarray, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, microscopía confocal, microscopía de fluorescencia y Delfia.

4. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la técnica es citometría de flujo y porque se utiliza un anticuerpo policlonal específico del péptido sintético de SEQ ID NO1 y donde se seleccionan linfocitos T de la muestra biológica.

5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a la 4 **caracterizado** porque la enfermedad autoinmune que se diagnóstica en c) pertenece al siguiente grupo: lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide.

6. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a la 4 **caracterizado** porque la enfermedad autoinmune que se diagnóstica en c) pertenece al siguiente grupo: espondilitis anquilosante.

7. Anticuerpo útil para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedades autoinmunes **caracterizado** porque es un anticuerpo específico del péptido sintético de p38 α (VADPpYDQSFE) (SEQ ID NO1).

8. Anticuerpo según la reivindicación 7 **caracterizado** porque es policlonal o monoclonal.

9. Procedimiento de obtención del anticuerpo según las reivindicaciones 7 y 8 **caracterizado** porque es un anticuerpo policlonal y porque comprende las siguientes etapas:

i) inmunización del animal mediante un péptido que contenga una tirosina fosforilada (Tyr323) representativa de la Tyr323 fosforilada de la proteína p38, preferentemente con el péptido VADPpYDQSFE ((319-328)-C (pY323), SEQ ID NO1),

ii) una etapa de purificación de los anticuerpos de isotipo IgG,

iii) una etapa de purificación de los anticuerpos que reconocen el péptido VADPpYDQSFE ((319-328)-C (pY323) fosforilado, por ejemplo, la IgG se pasa a través de una columna tiopropilsefarosa 6B acoplada con el péptido p38 α (319-328)C(323pY), y opcionalmente

iv) preparación del anticuerpo de la invención para posteriores estudios.

10. Procedimiento según la reivindicación 9 **caracterizado** porque el antígeno utilizado para inmunizar el animal en i) es el péptido VADPpYDQSFE ((319-328)-C(pY323), SEQ ID NO1).

11. Uso del anticuerpo según las reivindicaciones 7 y 8 en el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento, *in vitro* de enfermedades, desórdenes o patologías que cursan con alteración de la quinasa p38.

12. Uso del anticuerpo según la reivindicación 11 **caracterizado** porque la enfermedad, desorden o patología es de origen autoinmune perteneciente al siguiente grupo: Artritis reumatoide juvenil, Osteoartritis, Artritis psoriática, Esclerosis múltiple, *Miastenia gravis*, Lupus eritematoso sistémico, Lupus eritematoso cutáneo, Diabetes mellitas, Nefritis autoinmune o lúpica, Síndrome GoodPateur, Enfermedad de Addison autoinmune, Tiroiditis autoinmune, Dermatitis atópica, Dermatitis eccematosa, Psoriasis, Pénfigo, Síndrome Sjögren, *Alopecia areata*, Respuesta alérgica debida a infección por picadura de artrópodos, Enfermedad inflamatoria intestinal (Enfermedad de Crohn y Colitis ulcerosa), Enfermedad celiaca, Úlcera aftosa, Iritis, Conjuntivitis, Queratoconjuntivitis, Asma, Asma alérgico, Escleroderma, Tiroiditis, Vaginitis, Prostatitis, Erupción por drogas, Reacciones de inversión en la lepra, Eritema nodoso

ES 2 324 083 A1

leproso, Uveítis autoinmune (anterior, intermedia y posterior), Encefalomiелitis alérgica, Encefalomiелitis autoinmune, Fiebre reumática, Encefalopatía hemorrágica aguda necrotizante, Pérdida del oído sensoneuronal progresiva bilateral idiomática, Gingivitis, Anemia aplásica, Aplasia pura de células roja, Trombocitopenia idiomática, Policondritis, Granulomatosis de Wegener, Hepatitis crónica activa, Síndrome de Stevens-Johnson, Esprue idiomático, Manifestaciones cutáneas del liquen plano, Oftalmopatía de Graves, Sarcoidosis, Cirrosis biliar primaria, Fibrosis pulmonar intersticial, Pancreatitis Linfoplasmocitaria Esclerosante y Pancreatitis aguda.

13. Uso del anticuerpo según la reivindicación 11 **caracterizado** porque la enfermedad, desorden o patología es de origen tumoral.

14. Uso del anticuerpo según la reivindicación 11 **caracterizado** porque la enfermedad, desorden o patología es de origen inflamatorio perteneciente al siguiente grupo: enfermedad de injerto contra huésped en trasplantes e infecciones virales.

15. Uso del anticuerpo según las reivindicaciones 7 y 8 en un procedimiento biotecnológico de identificación de la proteína p38 fosforilada en la Y323 perteneciente al siguiente grupo:

i) procedimiento de identificación de compuestos, preferentemente inhibidores, que alteran la actividad de la proteína p38 mediada por dicha Y323 fosforilada, o en un

ii) procedimiento de elaboración de una composición terapéutica útil para el tratamiento de enfermedades que cursen con una alteración de la expresión de esta forma fosforilada Y323 de p38.

16. Composición farmacéutica o medicamento útil para el tratamiento de enfermedades que cursen con alteración de la proteína p38 fosforilada en Y323 **caracterizado** porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo específico de la proteína p38 fosforilada en Y323, ya sea monoclonal o policlonal, preferentemente un anticuerpo policlonal específico del péptido de secuencia SEQ ID NO1, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

17. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 16 en un método de tratamiento de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una enfermedad que cursa con alteración de la expresión de la proteína p38 fosforilada en Y323 consistente en la administración de dicha composición terapéutica que inhibe la actividad de dicha proteína.

18. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 17 **caracterizado** porque la enfermedad pertenece al siguiente grupo: enfermedades autoinmunes -preferentemente, lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide-, alérgicas, inflamatorias, alteraciones linfoproliferativas como leucemias y cánceres.

Fig. 1A

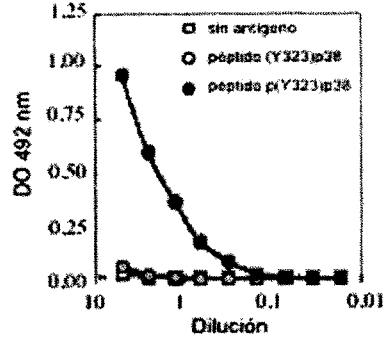


Fig. 1B

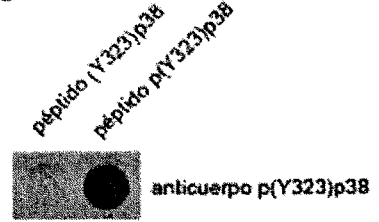


Fig. 1C

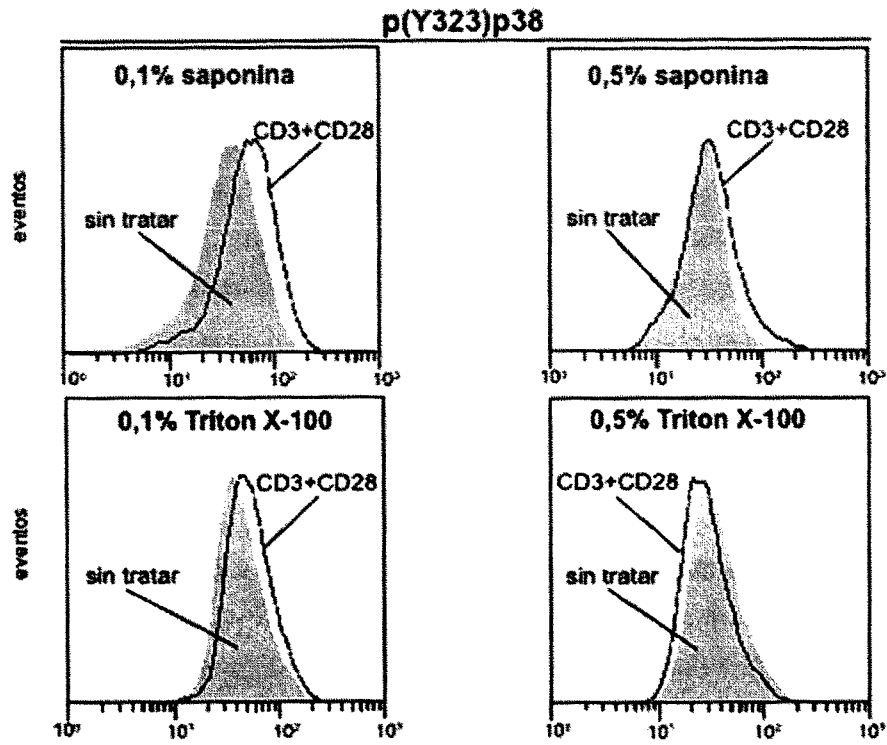


Fig. 1D

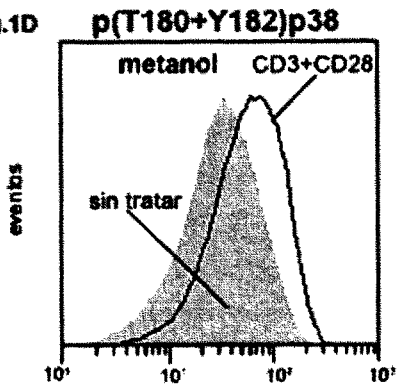


Fig. 1E

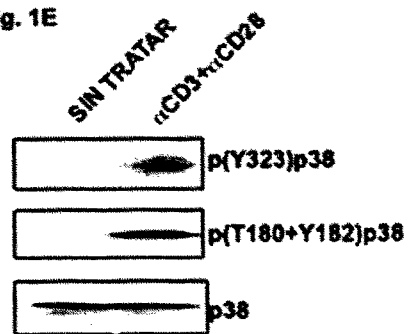


Fig. 2A

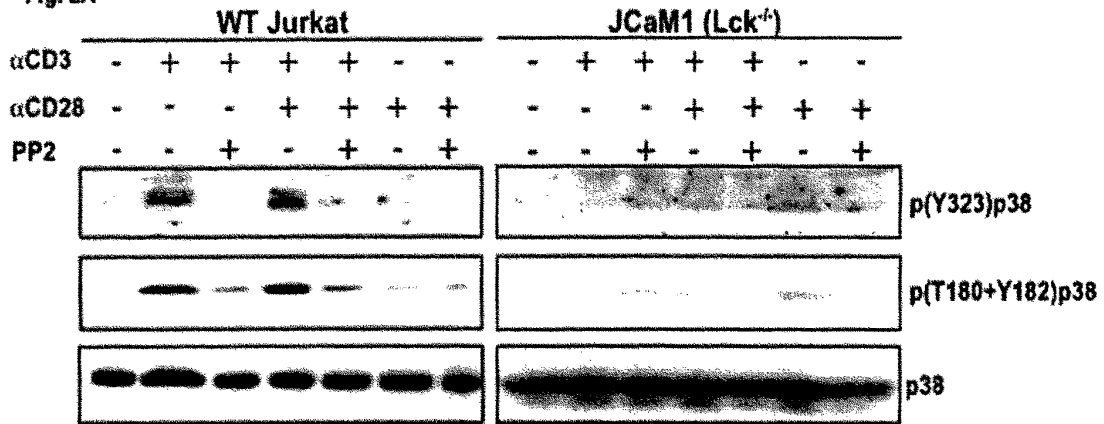


Fig. 2B

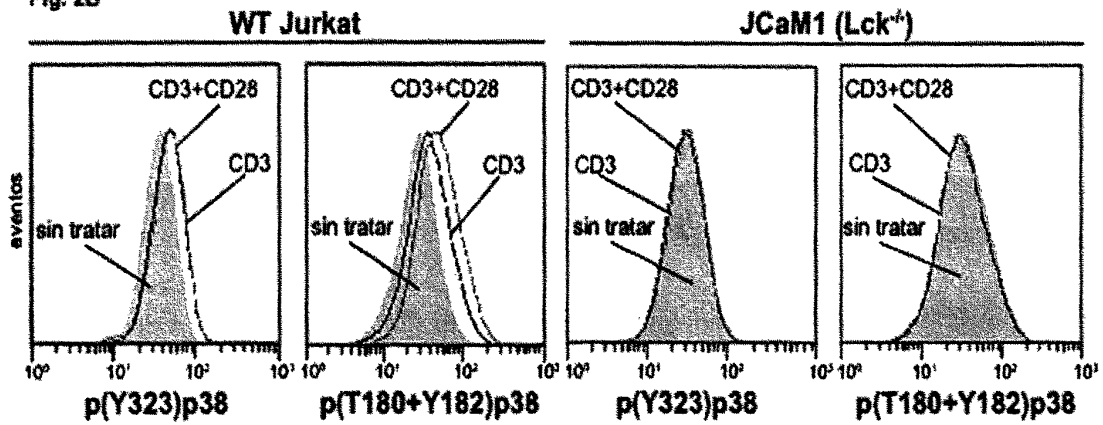


Fig. 2C

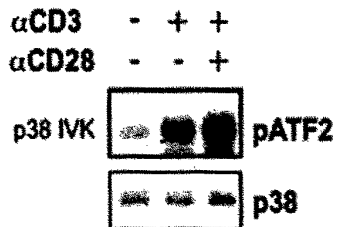


Fig. 2D

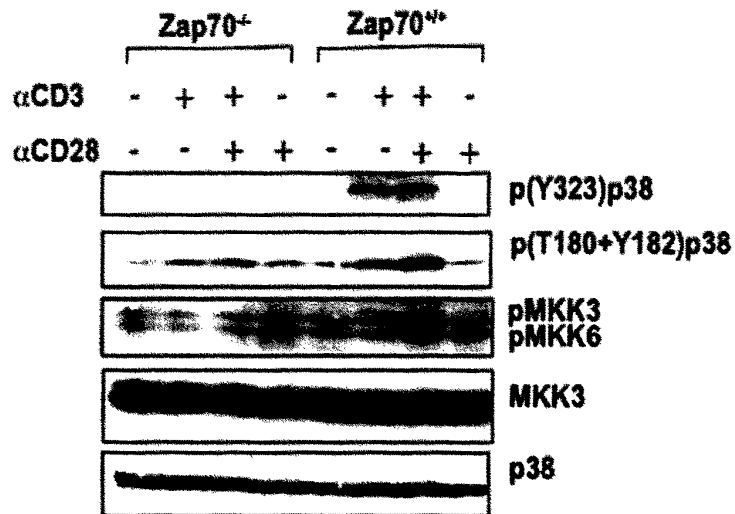


Fig. 3

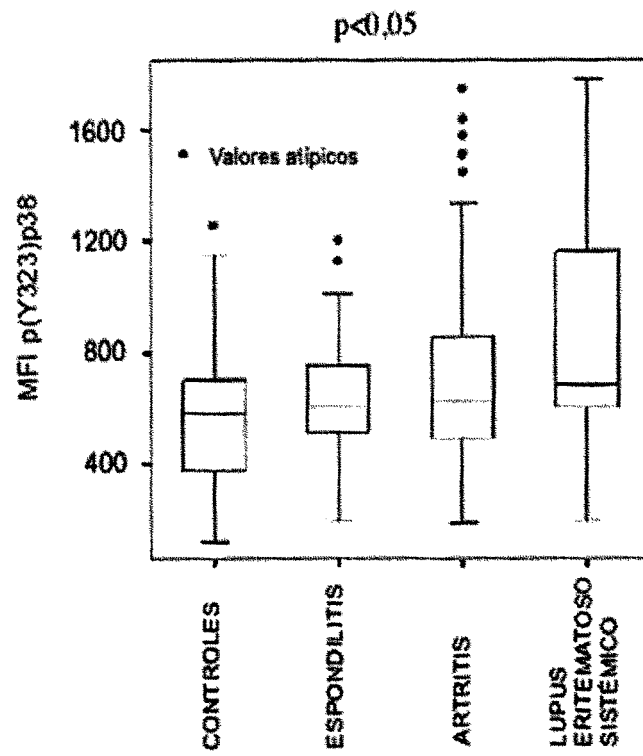


Fig. 4A

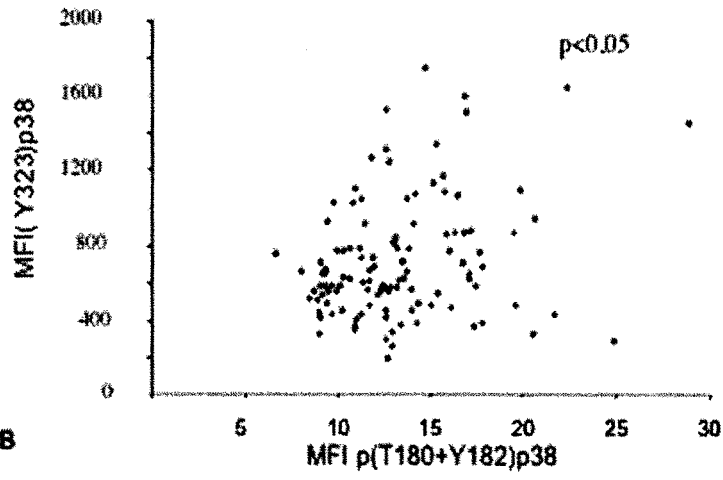


Fig. 4B

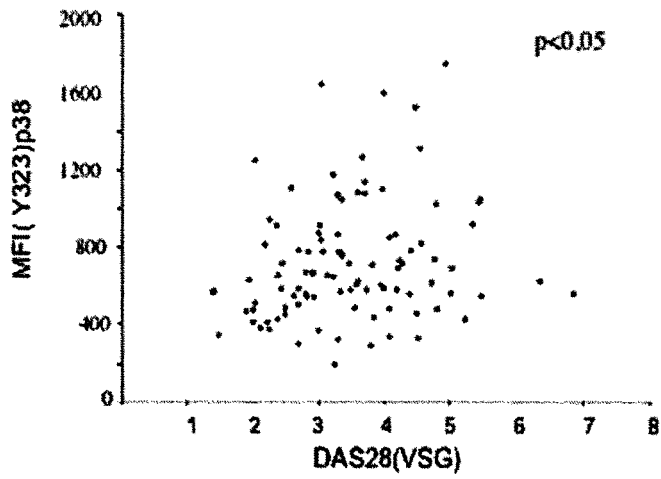


Fig. 4C

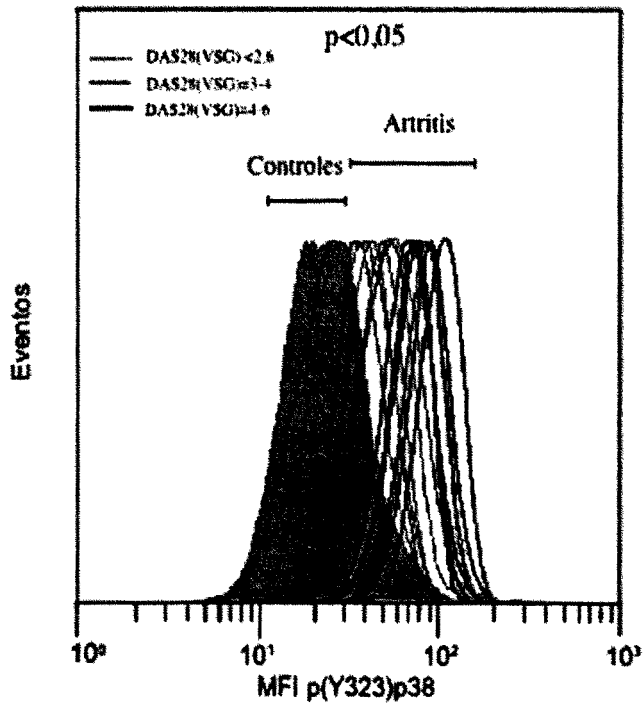


Fig. 5A

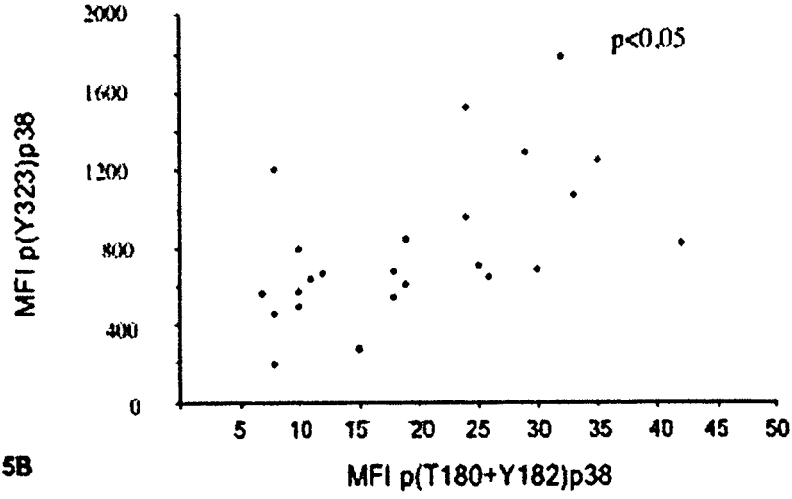


Fig. 5B

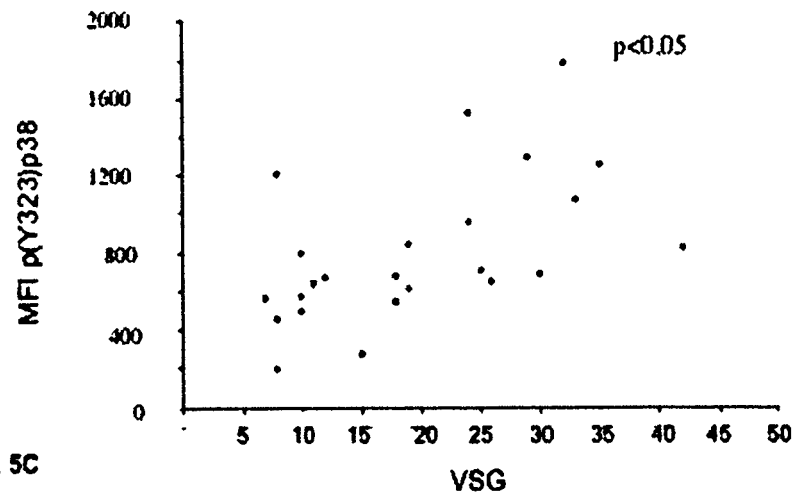


Fig. 5C

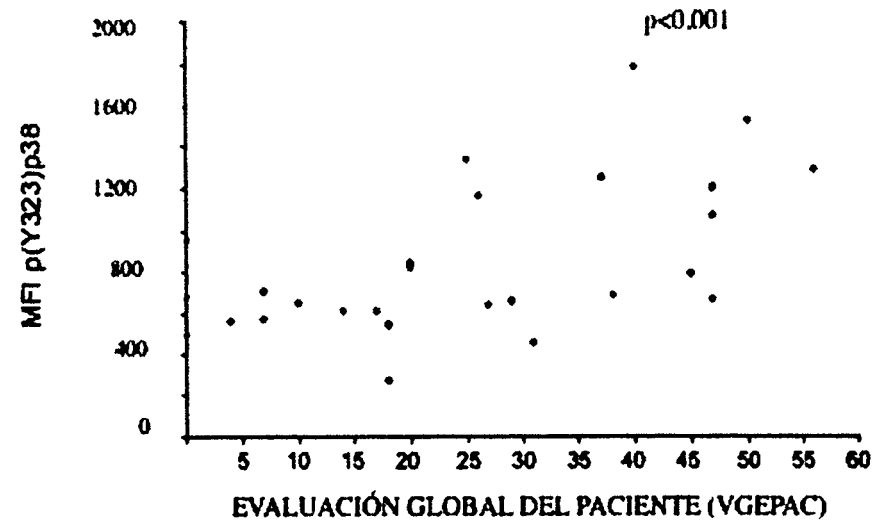


Fig. 6A

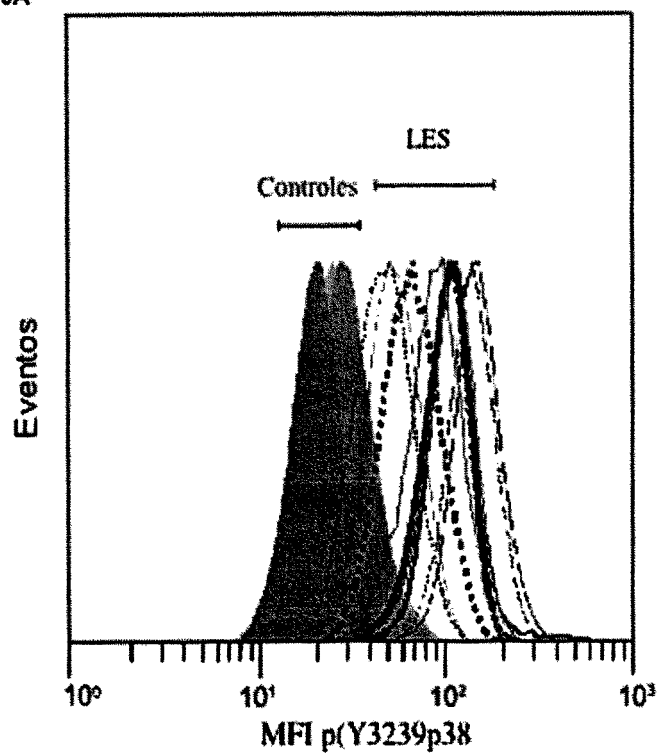
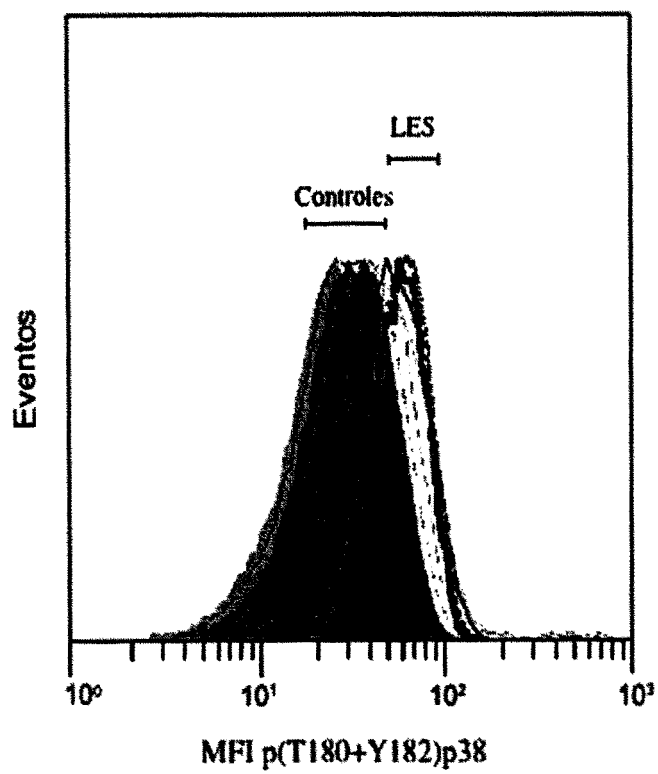


Fig. 6B





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 324 083

② N° de solicitud: 200702770

③ Fecha de presentación de la solicitud: **22.10.2007**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2005077983 A2 (GOVERNMENT OF THE USA as represented by THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES). 30.11.2004, página 2, líneas 20-28; página 3, línea 1 - página 5, línea 25; reivindicaciones 2, 4, 7-13, 17-21, 23-28.	1-18
X	COMB MJ. Phospho-specific antibodies: New Tools to Study Protein Phosphorylation. The NEB Transcript (A Scientific Newsletter from New England Biolabs). 1995. Vol. 7(1), páginas 1-4, especialmente página 2, columnas 2,3.	9
X	WO 2004014907 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG). 30.11.2004, página 27, línea 14 - página 28, línea 15; reivindicaciones 21-22.	6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

08.07.2009

Examinador

Mª D. García Grávalos

Página

1/6



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 324 083

② Nº de solicitud: 200702770

③ Fecha de presentación de la solicitud: 22.10.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SALVADOR JM et al. Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. Nature Immunology. 2005. Vol. 6(4), páginas 390-395, especialmente página 390, resumen.	1-18
A	WO 2007028430 A1 (UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID). 15.03.2007, página 2, líneas 11-29; página 12, línea 31 - página 32, línea 16.	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

08.07.2009

Examinador

Mª D. García Grávalos

Página

2/6

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 16/40 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

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

C07K, G01N, A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.07.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-18	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-18	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2005077983 A2	25-08-2005
D02	COMB MJ. The NEB Transcript . Diciembre 1995. Vol. 7(1), páginas 1-4.	1995
D03	WO 2004014907 A1	19-02-2004
D04	SALVADOR JM et al. Nature Immunology. 2005. Vol. 6(4), páginas 390-395.	2005
D05	WO 2007028430 A1	15-03-2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga un procedimiento de diagnóstico y pronóstico de una enfermedad autoinmune, mediante la determinación in vitro del nivel de fosforilación de la quinasa p38 en el residuo tirosina Y323, con ayuda del anticuerpo policlonal, anti-pTyr 323, específico para el péptido sintético identificado como SEQ ID NO1. Se reivindica también dicho anticuerpo y el procedimiento de obtención, así como su uso, por una parte, para diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de enfermedades relacionadas con alteraciones de la quinasa p38, que pueden ser autoinmunes, de origen tumoral, trasplantes o infecciones virales y, por otra, en un procedimiento biotecnológico de identificación de la proteína p38 fosforilada en la Y323, ya sea para identificar compuestos que alteran la actividad de dicha proteína p38 mediada por la Y323 fosforilada o en una composición farmacéutica para tratamiento de enfermedades relacionadas con la expresión de dicha forma fosforilada de p38. La invención se refiere también al uso de dicha composición farmacéutica para tratamiento de enfermedades relacionadas con alteraciones de la quinasa p38, que pueden ser autoinmunes, alérgicas, inflamatorias o en procesos de tumores y cáncer, (reivindicaciones 1-18).

El documento D01 se refiere a que la proteína quinasa p38 en algunos tipos de células, como las células T, es fosforilada únicamente en la tirosina Y323. En base a este descubrimiento, divulga composiciones y métodos para modular la actividad de la p38 mediante fosforilación de la Y323, incluyendo un anticuerpo específico para un péptido, fosforilado o no en el residuo tirosina Y323, de la p38. También se refiere composiciones farmacéuticas y a métodos de diagnóstico y tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema autoinmune (ver página 2, líneas 20-28; página 3, línea 1 - página 5, línea 25; reivindicaciones 2, 4, 7-13, 17-21, 23-28).

El documento D02 estudia los anticuerpos fosfoespecíficos como nuevas herramientas para el estudio de la fosforilación de proteínas, refiriéndose especialmente a las quinasas activadas por mitógenos y, a que el desarrollo de anticuerpos fosfotirosina específicos ha contribuido al análisis de la fosforilación de proteínas. La inmunización de animales con fosfopéptidos de 10-15 aminoácidos, unidos a hemocianina, proporciona un antisuero policlonal del que se obtienen los anticuerpos fosfoespecíficos por cromatografía de afinidad en dos pasos (ver página 2, columnas 2,3).

El documento D03 divulga una serie de compuestos para su uso como composiciones farmacéuticas o medicamentos para tratamiento o prevención de una enfermedad relacionada con una alteración en la proteína quinasa p38; por ej., artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso y otras enfermedades de tipo inflamatorio, inmunológico, tumoral, etc. (ver página 27, línea 14 - página 28, línea 15; reivindicaciones 21-22).

El documento D04 se refiere a las proteínas quinasas activadas por mitógenos y a su función clave como reguladoras en la respuesta inmune. La señalización de p38 está implicada en muchos procesos fisiológicos y su actividad está regulada por una compleja cascada de fosforilación que produce una doble fosforilación en los residuos Thr180-Tyr182. En este documento, se identifica una nueva vía, alternativa, de activación de p38 mediada por la tirosina quinasa Zap70 que fosforila a p38 en un residuo de tirosina situado en la posición 323, induciendo un proceso de auto fosforilación y activación de p38. Esta ruta alternativa proporciona una diana para estudios relacionados con la actividad de p38 en tejidos específicos (ver página 390, resumen).

Hoja adicional

El documento D05 se refiere a un nuevo sitio de fosforilación para las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) que se encuentra en el residuo treonina, en la posición 123, de la quinasa p38. Estas proteínas, fosforiladas en Thr123 pueden ser empleadas para diagnóstico de una enfermedad en la que está involucrada una proteína MAPK. También se refiere a una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo específico o un compuesto capaz de unirse a una proteína MAPK, así como un método de tratamiento y seguimiento una enfermedad, mediada por una MAPK activada, mediante la determinación de los niveles de proteína y detección de la fosforilación en el residuo treonina, Thr123 (ver página 2, líneas 11-29; página 12, línea 31 - página 32, línea 16).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986)

El objeto técnico de la invención es un procedimiento de diagnóstico, pronóstico y tratamiento de una enfermedad autoinmune, basándose en la determinación in vitro del nivel de fosforilación de la quinasa p38 en el residuo tirosina Y323, con ayuda del anticuerpo policlonal, anti-pTyr 323, específico para el péptido sintético identificado como SEQ ID NO1.

1.1. REIVINDICACIONES 1-18

El documento D01 se considera el mas cercano al estado de la técnica ya que anticipa un procedimiento de diagnóstico, pronóstico y tratamiento de una enfermedad autoinmune, basándose en la determinación in vitro del nivel de fosforilación de la quinasa p38 en el residuo tirosina Y323, incluyendo una serie de péptidos, fosforilados o no, entre los que se encuentra el identificado como SEQ ID NO13 que coincide con la SEQ ID NO1 de la invención; anticipando al mismo tiempo un anticuerpo policlonal, anti-pTyr 323, específico para dicho péptido. Aunque el documento D01 no especifica ni reivindica el procedimiento de obtención de dicho anticuerpo policlonal, se considera la obtención de estos anticuerpos es de sobra conocida en el estado de la técnica, no aportando la presente invención ninguna característica especial. Del mismo modo, la espondilitis anquilosante es un tipo de artritis o enfermedad inflamatoria crónica que no aporta ninguna característica técnica especial a la invención.

El documento D02 anticipa la obtención de anticuerpos fosfotirosina específicos en quinasas activadas por mitógenos, inmunizando al animal con fosfopéptidos sintéticos, de 10-15 aminoácidos, y purificando los anticuerpos policlonales por doble cromatografía a partir del antisuero policlonal obtenido, de modo que sería obvio para un experto en la materia aplicar esta metodología para la obtención del péptido identificado en la invención como SEQ ID NO1.

Por otra parte, el documento D03 anticipa el uso de compuestos que interfieren en la activación de la proteína quinasa p38 para tratamiento o prevención de enfermedades de tipo inflamatorio como la espondilitis anquilosante, de lo que se deduce que sería obvio para un experto en la materia el uso del péptido identificado en la invención como SEQ ID NO1 en un procedimiento de diagnóstico, pronóstico y tratamiento de esta enfermedad.

Según lo expuesto en el documento D01, la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-18 carece de novedad y de actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986)

Según lo divulgado en los documentos D02 y D03, las reivindicaciones 6, 9 no cumplen con el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)

Los documentos D04-D05, se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.