



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 351 456**

② Número de solicitud: 200930349

⑤ Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **24.06.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **04.02.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
04.02.2011

⑦ Solicitante/s: **Fundació Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebrón**
Passeig Vall d'Hebrón, 119-129
08035 Barcelona, ES

⑦ Inventor/es: **Juliá Cano, Antonio y Marsal Barril, Sara**

⑦ Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

⑤ Título: **Método *in vitro* para el pronóstico o predicción de la respuesta por parte de pacientes con artritis reumatoide al tratamiento con agentes que reconocen el receptor de membrana CD20 de los linfocitos B.**

⑦ Resumen:

Método *in vitro* para el pronóstico o predicción de la respuesta por parte de pacientes con artritis reumatoide al tratamiento con agentes que reconocen el receptor de membrana CD20 de los linfocitos B. El método de la invención comprende la determinación en una muestra de sangre de dichos pacientes y mediante la cuantificación del nivel de expresión transcripcional (ARNm), antes de iniciar el tratamiento, de al menos uno de los genes seleccionado del grupo: ARG1, CPD, TRAF1, C1QA, LRRN3, HLA-DQA1, NLK, TLR4, LOC89944, TOM1L1, BACH, NCALD, EIF2C2, NFIC, PCDHB7, FLJ32770, ARID3A, C14ORF9, CSNK1E, BCAS1, TEAD2, C6orf145 y SN-TA1; y la comparación de dicho nivel de expresión con respecto a los valores de expresión previamente obtenidos de pacientes que demostraron ser respondedores al tratamiento o no respondedores al mismo.

ES 2 351 456 A1

DESCRIPCIÓN

Método *in vitro* para el pronóstico o predicción de la respuesta por parte de pacientes con artritis reumatoide al tratamiento con agentes que reconocen el receptor de membrana CD20 de los linfocitos B.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método *in vitro* (en adelante método de la invención) para el pronóstico o predicción de la respuesta al tratamiento con agentes que reconocen el receptor de membrana CD20 de los linfocitos B, como por ejemplo rituximab, por parte de pacientes con Artritis Reumatoide (AR). Así, la presente invención puede englobarse dentro del campo de la medicina personalizada, de la reumatología o de la genética humana como campo que estudia las enfermedades de base genética.

Estado de la técnica

La AR es una de las enfermedades autoinmunes más frecuentes en el mundo (prevalencia mundial ~ 1%). La AR conduce a la inflamación crónica de las articulaciones sinoviales y al desarrollo de daño articular progresivo que puede dar lugar a una marcada incapacidad funcional. Además, la AR es una enfermedad muy heterogénea y compleja en todos sus aspectos, incluyendo tanto sus manifestaciones clínicas como la variabilidad en su respuesta a las diferentes terapias.

Fruto de la intensa investigación llevada a cabo durante los últimos años, se han identificado varios tratamientos para el control de la AR. Rituximab es un anticuerpo monoclonal que reconoce el receptor de membrana CD20, específico de linfocitos B. La unión de rituximab con CD20 provoca una depleción transitoria de los linfocitos B. En principio, el fármaco se diseñó para el tratamiento de los linfomas B de tipo No Hodgkin. Recientemente, se ha podido comprobar que también es un tratamiento eficaz para controlar la AR [Edwards, J. C. *et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. N Engl J Med* 350, 2572-81 (2004)].

Sin embargo, existe un porcentaje de pacientes que no responden al tratamiento con agentes que reconocen el receptor de membrana CD20 de los linfocitos B y deben ser redirigidos hacia terapias alternativas. Por lo tanto, los métodos para el pronóstico o predicción de los pacientes que se pueden beneficiar de este tratamiento y su diferenciación de los pacientes no respondedores a dicho tratamiento que serán focalizados hacia terapias alternativas, son una necesidad creciente dirigida hacia el reto que supone la medicina individualizada.

El artículo [Dass, S. *et al. Highly sensitive B cell analysis predicts response to rituximab therapy in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum* 58, 2993-9 (2008)] divulga la asociación entre el nivel de depleción de linfocitos B y la respuesta clínica al cabo de varias semanas. En particular, los individuos en los que la depleción es incompleta, la respuesta a rituximab es peor. La asociación es estadísticamente significativa pero no muy fuerte ($P = 0.01$). Además, la predicción en este estudio se realiza después de realizar el tratamiento.

En el documento [Teng, Y. K. *et al. Immunohistochemical analysis as a means to predict responsiveness to rituximab treatment. Arthritis Rheum* 56, 3909-18 (2007)] se divulga la positividad para los anticuerpos anti-péptidos citrulinados (anti_CCPs) en suero en aquellos pacientes con una alta infiltración de linfocitos B CD79a+ en la membrana sinovial. El problema de este método es que sólo permite predecir un subgrupo de pacientes y, además, requiere la obtención de una biopsia sinovial. Comparado con la extracción de sangre, la extracción de biopsias sinoviales es un método altamente invasivo para el paciente y muy poco práctico (pocos centros clínicos cuentan con el personal entrenado y la tecnología para realizarlo).

En el documento [Cohen, S. B. *et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. Arthritis Rheum* 54, 2793-806 (2006)] se divulga uno de los primeros estudios donde se evaluaba la eficacia y seguridad de rituximab en AR. Encuentran una leve asociación de la respuesta con el Factor Reumatoide aunque con poca significación.

En [Roll, P., Dornier, T. & Tony, H. P. *Anti-CD20 therapy in patients with rheumatoid arthritis: predictors of response and B cell subset regeneration after repeated treatment. Arthritis Rheum* 58, 1566-75 (2008)] se lleva a cabo un análisis de citometría de flujo pero, como en Dass *et al.*, encuentran avocaciones débiles de subgrupos de linfocitos con la respuesta clínica después del tratamiento.

Ninguno de los documentos localizados en el estado de la técnica describe los genes, cuyo nivel de expresión es analizado en la presente invención, con el objetivo de pronosticar la respuesta al tratamiento con agentes que reconocen el receptor de membrana CD20 de los linfocitos B, como por ejemplo rituximab, por parte de pacientes con AR. Por lo tanto, no se ha localizado en el estado de la técnica ninguna evidencia relacionada con la utilización de los genes citados en la presente invención, los cuales, tal y como se explica en la descripción, han sido específicamente seleccionados mediante un exhaustivo proceso de cribado entre miles de genes.

Así, la presente invención soluciona los problemas planteados en el estado de la técnica presentando un método para el pronóstico o predicción de los pacientes que se pueden beneficiar del tratamiento con agentes que reconocen

el receptor de membrana CD20 de los linfocitos B y su diferenciación de los pacientes no respondedores a dicho tratamiento que serán focalizados hacia terapias alternativas.

Descripción de la invención

5

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para el pronóstico o predicción de la respuesta al tratamiento con agentes que reconocen el receptor de membrana CD20 de los linfocitos B por parte de pacientes con AR, que comprende la determinación en una muestra de sangre de dichos pacientes y mediante la cuantificación del nivel de expresión transcripcional (ARNm), antes de iniciar el tratamiento, de al menos uno de los genes seleccionado de las Tablas 1 a 3, particularmente del grupo: ARG1, CPD, TRAF1, C1QA, LRRN3, HLA-DQA1, NLK, TLR4, LOC89944, TOM1L1, BACH, NCALD, EIF2C2, NFIC, PCDHB7, FLJ32770, ARID3A, C14ORF9, CSNK1E, BCAS1, TEAD2, C6orf145 y SNTA1; y la comparación de dicho nivel de expresión con respecto a los valores de expresión previamente obtenidos de pacientes que demostraron ser respondedores al tratamiento o no respondedores al mismo.

En una realización preferida de la invención dicho pronóstico se realiza a través del valor de expresión resultante del ratio ARG1/TRAF1 en sangre total. En los pacientes no respondedores la expresión de ARG1 es superior a TRAF1 (ratio positivo) y en todos los pacientes respondedores es al revés (ratio negativo). A su vez, la elevada expresión de ARG1 está claramente asociada a la falta de respuesta así como la elevada expresión de TRAF1 es predictiva de una respuesta clínica a rituximab favorable.

Tal y como se observa en las Tablas 1 a 3, debe tenerse en cuenta que, de entre los genes particularmente preferidos, los genes sobre-expresados en pacientes respondedores o infra-expresados en pacientes no-respondedores antes de iniciar el tratamiento son:

- TRAF1, LRRN3 y NLK en sangre total.
- TLR4, TOM1L1, PCDHB7 y FLJ32770 en células CD4+T.
- C14ORF9, CSNK1E, BCAS1, TEAD2, C6orf145 y SNTA1 en células B.

Además, de entre los genes particularmente preferidos, los genes infra-expresados en pacientes respondedores o sobre-expresados en pacientes no-respondedores antes de iniciar el tratamiento son:

- ARG1, CPD, C1QA y HLA-DQA1 en sangre total.
- LOC89944, BACH, NCALD, EIF2C2 y NFIC en células CD4+T.
- ARID3A en células B.

Así, el problema técnico resuelto por la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el pronóstico o predicción de la respuesta al tratamiento con agentes que reconocen el receptor de membrana CD20 de los linfocitos B (como por ejemplo rituximab) por parte de pacientes aquejados de AR, a partir de células sanguíneas tomadas de muestras de sangre total de dichos pacientes (comprenden el 100% de las poblaciones celulares en ella presentes y no sólo de las células PBMCs), que es sencillo (se basa en el análisis de un pequeño número de genes) y poco invasivo para el paciente (no requiere la realización de biopsias). Además, en la presente invención se analizó el patrón de expresión génica en subpoblaciones de células sanguíneas tales como las células CD4+T y las células B encontrándose una serie genes cuya expresión presenta una relación estadísticamente significativa con la respuesta de los pacientes con AR al tratamiento con rituximab.

Es importante hacer notar que cada uno de los genes estudiados en la presente invención, incluidos en las Tablas 1 a 3, tiene potencial predictivo por sí mismo. Por lo tanto en el método de la invención podría utilizarse, con suficientes visos de efectividad, cualquiera de los genes comprendido en las Tablas 1 a 3, particularmente seleccionado del grupo: ARG1, CPD, TRAF1, C1QA, LRRN3, HLA-DQA1, NLK, TLR4, LOC89944, TOM1L1, BACH, NCALD, EIF2C2, NFIC, PCDHB7, FLJ32770, ARID3A, C14ORF9, CSNK1E, BCAS1, TEAD2, C6orf145 y SNTA1, así como cualquier sub-combinación de los mismos con un número de genes ≥ 2 , o el conjunto de genes en su totalidad.

Además en la presente invención se aísla y se analiza el ARNm de sangre total, sin realizar ningún fraccionamiento previo. El perfil de expresión, por tanto, incluye todas las poblaciones celulares de la sangre. Este aspecto adquiere importancia al tener en cuenta que cada tipo o población celular pueden tener asociados diferentes perfiles de expresión génica.

El tipo de muestra tomada en una realización preferida de la presente invención (sangre total) hace que el método sea muy poco invasivo para el paciente al no requerir biopsias sinoviales para la extracción de las muestras, pudiéndose aplicar a todos los pacientes con AR. En comparación con la muestra sinovial, la muestra sanguínea puede ser obtenida en cualquier centro clínico con muy poco riesgo para el paciente. En particular, los genes identificados utilizando el método PaxGene (ver ejemplo 2) para preservar el ARN, son los que permiten un procesamiento más rápido ya que no

es necesario llevar a cabo ningún paso de separación celular. En cambio, los genes identificados en CD4+ y linfocitos B, requieren un procedimiento técnico más laborioso.

La predicción de la respuesta al tratamiento por parte de pacientes aquejados de AR es útil en dos sentidos principales:

1. Predicción de pacientes no respondedores al tratamiento con agentes que reconocen el receptor de membrana CD20 de los linfocitos B: de esta forma se podría dirigir al paciente hacia tratamientos alternativos sin necesidad de aplicarle, como primer tratamiento, la terapia con agentes que reconocen el receptor de membrana CD20 de los linfocitos B. Algunos de los posibles efectos secundarios debidos al tratamiento con agentes que reconocen el receptor de membrana CD20 de los linfocitos B se citan en la referencia: [*Long term treatment of rheumatoid arthritis with rituximab. Autoimmunity Reviews, Volume 8, Issue 7, June 2009, Pages 591-594 Roberto Caporali, Marta Caprioli, Francesca Bobbio-Pallavicini, Serena Bugatti and Carlomaurizio Montecucco*]
2. Predicción de respondedores al tratamiento con agentes que reconocen el receptor de membrana CD20 de los linfocitos B: esta herramienta es muy útil para empezar el tratamiento de forma temprana ya que en el caso particular de la AR se ha demostrado que el tratamiento en fases precoces de la enfermedad pueden ser muy efectivas evitando el avance de las erosiones articulares.

Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra el análisis jerárquico de las mediciones del índice de mejora ReIDAS28 (ver ejemplo 1) de los pacientes tratados con rituximab. Se identificaron claramente dos grupos distintos de pacientes. A partir de estos resultados los pacientes fueron clasificados como respondedores al tratamiento con rituximab (n=4, cluster izquierdo) o no respondedores (n=5, cluster derecho). La altura (h) del dendrograma corresponde a la diferencia entre los individuos calculada, en este caso, mediante la distancia euclídea. En este sentido, las diferencias más grandes (grupos más diferenciados o “clusters”) serán aquellas que se den antes en el árbol y las menores corresponderán a las últimas ramificaciones. Las siglas R1, R2, R3 y R4 significan respectivamente: Respondedor 1, Respondedor 2, Respondedor 3 y Respondedor 4. Las siglas NR1, NR2, NR3, NR4 y NR5 significan respectivamente: No respondedor 1, No respondedor 2, No respondedor 3, No respondedor 4 y No respondedor 5.

Figura 2. Muestra que el ratio entre la expresión de los genes ARG1 y TRAF1 (ARG1/TRAF1) en pacientes respondedores al tratamiento con rituximab (diamantes del cuadrante inferior izquierdo y no respondedores (diamantes de cuadrante superior derecho) es consistente en el análisis por microarray (eje X) y por RT-PCR (eje Y). Además se separan claramente ambos grupos de pacientes.

Figura 3. Muestra la expresión de los genes ARG1 y TRAF1 en sangre total de los pacientes tratados con rituximab. Se puede ver claramente como en los no respondedores la expresión de ARG1 es superior a TRAF1 (ratio positivo) y en todos los pacientes respondedores es al revés (ratio negativo). A su vez, la elevada expresión de ARG1 está claramente asociada a la falta de respuesta así como la elevada expresión de TRAF1 es predictiva de una respuesta clínica a rituximab favorable.

Descripción detallada de la invención

En la presente invención se evaluaron los perfiles de ARN en tres poblaciones diferentes de células de la sangre (sangre total, células CD4+ y linfocitos B) para identificar genes asociados con la respuesta de pacientes con AR al tratamiento con agentes que reconocen el receptor de membrana CD20 de los linfocitos B. Como consecuencia de dicha evaluación se identificaron marcadores capaces de predecir la respuesta de pacientes con AR al tratamiento con agentes que reconocen el receptor de membrana CD20 de los linfocitos B, de forma previa al inicio del tratamiento con dichos agentes.

Así, por ejemplo, se evidenció que un aumento de la expresión del gen ARG1 en la sangre total está significativamente asociado con un peor resultado en la terapia con agentes que reconocen el receptor de membrana CD20 de los linfocitos B. Recientemente se ha descubierto que el gen ARG1 es un importante modulador de la respuesta inflamatoria mediante la reducción de la disponibilidad extracelular de arginina y, por lo tanto, del sustrato para la producción del Oxido Nítrico pro-inflamatorio. Paradójicamente, el segundo gen más asociado con la respuesta a terapia en la sangre total, que además se encuentra sobre-expresado en pacientes no respondedores al tratamiento con rituximab, es el CPD que codifica para la carboxipeptidasa D. La carboxipeptidasa D es una exopeptidasa que aísla residuos de arginina de proteínas aumentando la disponibilidad de la arginina libre para la producción de Oxido Nítrico. La síntesis de Oxido Nítrico a partir de arginina produce citrulina que es el antígeno de los anticuerpos anti-CCP. Estos hallazgos sugieren que este mecanismo de acción es relevante en la AR. Durante el análisis de la sangre total, además se evidenció que la sobre-expresión del gen TRAF1 está asociado con una respuesta positiva al rituximab por parte de pacientes con AR.

Además, se identificó un aumento en la expresión del gen TLR4 en células CD4+T en pacientes respondedores al tratamiento con rituximab.

ARID3A codifica para un factor de transcripción específico en las células B que aumenta la transcripción de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. En la presente invención se evidenció que dicho gen se encuentra sobreexpresado en pacientes con AR no respondedores a rituximab antes de iniciar el tratamiento.

5 Dichos hallazgos permitieron el diseño de un método *in vitro* para el pronóstico o predicción de la respuesta al tratamiento con agentes que reconocen el receptor de membrana CD20 de los linfocitos B por parte de pacientes con AR, que comprende la determinación en una muestra de sangre de dichos pacientes, y mediante la cuantificación del nivel de mRNA, del nivel de expresión de al menos uno de los genes comprendidos en las Tablas 1 a 3, particularmente en el grupo: ARG1, CPD, TRAF1, C1QA, LRRN3, HLA-DQA1, NLK, TLR4, LOC89944, TOM1L1, BACH,
10 NCALD, EIF2C2, NFIC, PCDHB7, FLJ32770, ARID3A, C14ORF9, CSNK1E, BCAS1, TEAD2, C6orf145 y SN-TA1, y la comparación de dicho nivel de expresión con respecto a los valores de expresión previamente obtenidos de pacientes que demostraron ser respondedores al tratamiento o no respondedores al mismo. En el caso de llevar a cabo el método de la invención en base al valor de expresión resultante del ratio ARG1/TRAF1, el pronóstico puede realizarse directamente sin comparar dicho valor con los valores obtenidos en individuos control.

15 Se identificó un grupo de genes significativamente asociados a la respuesta al tratamiento con rituximab en pacientes con AR usando un microarray. Se determinaron los genes estadísticamente significativos en la sangre total, células CD4+T y células B. Además, se llevó a cabo la validación de los candidatos más relevantes mediante RT-PCR. Los subgrupos de genes validados representan un nuevo grupo de marcadores para la predicción de la respuesta al
20 tratamiento con rituximab de los pacientes con AR.

Ejemplos

Ejemplo 1

25 *Selección de pacientes*

Inicialmente se seleccionaron los pacientes aquejados de AR en la Unidad de Reumatología del Hospital Universitario Vall d'Hebron (Barcelona, España). A todos los pacientes se les había diagnosticado AR siguiendo los criterios
30 establecidos por ACR "American College of Rheumatology". Los pacientes seleccionados para el tratamiento presentaban AR activa: índice DAS28 ("Disease activity score" > 5.1). La evaluación clínica de los pacientes usando el índice DAS28 se llevó a cabo cada tres meses de tratamiento. Todos los procedimientos realizados cumplen con la Declaración de Helsinki. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Vall d'Hebron.

35 Para ocho de los pacientes tratados con rituximab se obtuvo un resultado positivo en la prueba serológica del Factor Reumatoide (FR). Además cinco de los pacientes fueron anti-CCP (anti-cyclic cytrullinated peptide) positivos. Todos los pacientes fueron mujeres sobre las que el tratamiento con agentes anti-TNF había fallado. Después de la administración intravenosa de metilprednisona a una dosis de 100 mg, todos los pacientes recibieron una infusión de
40 1-gm de rituximab en los días 1 y 15 de tratamiento. La respuesta clínica a rituximab fue determinada en la semana 24 usando el índice RelDAS28. Con este método, la eficacia a un tratamiento particular es estimada a través de la mejora en el índice relativo DAS28. Posteriormente se aplicaron métodos analíticos ("clustering" jerárquico) para identificar grupos de pacientes con respuestas similares al tratamiento con rituximab (Figura 1).

Ejemplo 2

Recogida de sangre

50 Las muestras de sangre para la extracción de ARN fueron extraídas de los pacientes durante el día de la primera aplicación de rituximab.

En la presente invención se utilizó el sistema "PAXGene" (PreAnalytix, Suiza) para la preservación inmediata del ARN procedente de muestras de sangre total. Este sistema utiliza un agente preservante del ARN contenido en el mismo tubo de extracción de la sangre y, por lo tanto, los perfiles de sangre obtenidos son representativos de las
55 condiciones *in vivo*. Todos los tubos "PAXGene" se almacenaron congelados a -80°C hasta el aislamiento de ARN. El ARN fue extraído por medio del kit de aislamiento total "PAXGene" (Qiagen, USA). Finalmente la calidad del ARN de todas las muestras se evaluó usando el sistema de gel "BioAnalyzer" (Agilent, USA).

Ejemplo 3

Análisis por citometría de flujo

60 Se realizó el análisis por citometría de flujo en todos los pacientes incluidos en el estudio, el mismo día de la extracción de sangre para el análisis en el microarray. A partir de la muestra de sangre total se determinaron las subpoblaciones de leucocitos, así como las células rojas de la sangre. Con el objetivo de estimar el nivel de pureza celular obtenido en el paso de la selección de linfocitos, se llevó a cabo, además, la determinación por citometría de flujo de las células CD4+T y CD20+B.

ES 2 351 456 A1

Ejemplo 4

Análisis de expresión de los genes

5 El análisis de la expresión de genes de todo el genoma fue llevado a cabo utilizando el sistema “Illumina Human-6 v1 Beadchip array system (Illumina)”. Mediante el uso de la tecnología “bead-based”, el microarray empleado en la presente invención evaluó la expresión de 47.000 transcritos (www.illumina.com). Los ARN de buena calidad (ratio 28S/18S > 1.8, número RNA Integrity Number >9) fueron posteriormente procesados usando dicho protocolo estándar de Illumina. Después del mareaje e hibridación de la muestra, los “arrays” fueron leídos utilizando el lector de arrays “Illumina’s BeadArray Reader”. Los datos fueron extraídos utilizando el programa informático “Illumina BeadStudio”. El resto de pasos se realizaron utilizando el programa informático R (<http://cran.r-project.org/>) y su extensión para el análisis de datos genómicos en el programa “Bioconductor”. En el momento del análisis de los datos, se puso en marcha una versión actualizada del array “IlluminaHuman-6 v2, Beadchip array”. Esta nueva versión incorpora un sustancial rediseño de la secuencia de las sondas y, por lo tanto, el análisis del microarray fue restringido a la porción de las sondas que fueron consideradas “válidas” según la nueva versión del microarray (datos disponibles en www.illumina.com). Los valores de la expresión final de los transcritos fueron transformados a log2 y normalizados utilizando el método quantile normalization (Bolstad Bioinformatics '03). Antes de llevar a cabo cualquier análisis estadístico, se realizó un “clustering” jerárquico para detectar y descartar cualquier posible microarray con valores extremos (“outlier”).

Ejemplo 5

Análisis mediante RT-PCR

25 La transcripción reversa de las muestras de RNA obtenidas de los tres tipos de células fue llevado a cabo usando el “cDNA Archive Kit” de Applied Biosystems. La determinación mediante RT-PCR del conjunto de genes candidatos se realizó usando ensayos TaqMan prediseñados de Applied Biosystems. Para la sangre total se usaron los ensayos de expresión génica Hs00194639_ml y Hs00163660_ml con el objetivo de medir los genes TRAF1 y ARG1 respectivamente, y analizar la correlación con los datos del microarray usando el ratio obtenido de las dos mediciones. Para cada uno de los linfocitos candidatos se buscaron controles endógenos a partir del grupo de genes que mostraron una variación mínima en los datos del microarray.

Ejemplo 6

Análisis estadístico

40 Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo usando la metodología expuesta en [*R: A Language and Environment for Statistical Computing. In: R Development Core Team; 2006*], Los genes expresados diferencialmente entre los pacientes respondedores al tratamiento con rituximab y los no respondedores al mismo fueron determinados usando el test Welch implementado en el paquete multtest. Las correcciones del test fueron realizadas usando el método de Benjamini and Hochber False Discovery Rate. El análisis ontológico de genes se llevó a cabo usando la herramienta de análisis GStat [*Beissbarth T, SpeedTP. GStat: find statistically overrepresented Gene Ontologies within a group of genes. Bioinformatics 2004;20(9): 1464-5*], Las correlaciones entre el microarray y las medidas de la expresión génica mediante RTPCR fueron calculadas usando el coeficiente de correlación de Pearson.

Resultados

Ejemplo 7

Clasificación de pacientes

55 El análisis jerárquico de las mediciones RelDAS28 de los pacientes tratados con rituximab identificó claramente dos grupos distintos de pacientes (Figura 1). A partir de estos resultados los pacientes fueron clasificados como respondedores al tratamiento con rituximab (n=4, cluster izquierdo) o no respondedores (n=5, cluster derecho).

Ejemplo 8

Determinación de los genes asociados a la respuesta a rituximab

65 Mediante el análisis de la expresión génica en el microarray se identificaron 7 genes (ARG1, CPD, TRAF1, C1QA, LRRN3, HLA-DQA1 y NLK) diferencialmente expresados en los perfiles de sangre total de pacientes con AR tratados con rituximab (P<0,05). En el análisis de las células CD4+T y subpoblaciones de células B se identificaron 33 y 50 diferencialmente expresados entre respondedores y no respondedores. En las Tablas 1 a 3 se muestra una lista de los más significativos para cada uno de los tres tipos de células.

Ejemplo 9

Análisis de genes candidatos mediante RT-PCR

5 En la sangre total se identificó una gran correlación entre el microarray y las determinaciones RT-PCR ($r = 0.75$).
La Figura 2 muestra una clara separación entre respondedores y no respondedores al tratamiento con rituximab que
es obtenida usando los valores del microarray o la RT-PCR de los genes ARG1 y TRAF1. En la validación de las
células CD4+T se encontró además una gran correlación entre la determinación de TLR4 ($r = 0.91$). En las células B,
10 sin embargo, no se replicó la expresión diferencial observada en el microarray ($r = 0.47$).

(Tabla pasa a página siguiente)

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 351 456 A1

TABLA 1

Listado de genes diferencialmente expresados en células B (Linfocitos B) en pacientes con AR respondedores a la terapia con rituximab vs pacientes no respondedores. Los genes sombreados son los que presentaron mayor significación estadística

Nivel de Expresión	P (significación estadística)	Nº Acceso NCBI	Símbolo	Símbolos sinónimos
-2,12	1,88E-19	NM_005224.1	ARID3A	DRIL1;BRIGHT;E2FBP1
10 2,04	1,05E-11	NM_144568.1	C14orf9	MGC26684;DKFZp434M0519
1,61	2,14E-08	NM_001894.4	CSNK1E	HCKIE;MGC10398
1,48	1,67E-07	NM_003657.1	BCAS1	AIBC1;NABC1
1,51	3,64E-06	NM_003598.1	TEAD2	ETF;TEF4;TEF-4
15 1,48	1,98E-05	NM_183373.2	C6orf145	
1,63	8,08E-05	NM_003098.2	SNTA1	SNT1;TACIP1;dJ1187J4.5
-1,57	0,000235777	NM_004972.2	JAK2	
1,61	0,00027208	NM_012225.1	NUBP2	CFD1
1,83	0,000387337	NM_022489.1	FLJ22056	
20 1,49	0,000499237	NM_138783.1	LOC115950	
1,67	0,000718414	NM_006330.2	LYPLA1	LPL1;APT-1;LYSOPLA
-1,48	0,000808462	NM_002267.2	KPNA3	SRP4;IPOA4;hSRP1;SRP1gamma
1,52	0,000808462	NM_032815.2	FLJ14639	
1,77	0,001108053	NM_024667.1	FLJ12750	
25 -1,64	0,001299768	NM_005248.1	FGR	SRC2;c-fgr;p55c-fgr
1,52	0,001546683	NM_175870.3	LOC90925	
1,47	0,002544314	NM_138447.1	LOC115509	
-1,66	0,00347845	NM_000402.2	G6PD	G6PD1
1,46	0,00347845	NM_012239.3	SIRT3	SIR2L3
30 -1,56	0,004199385	NM_019043.2	APBB1IP	RIAM;INAG1
1,63	0,004199385	NM_013337.1	TMM22	TEX4;TIM22
1,48	0,005042721	NM_053004.1	GNB1L	GY2;FKSG1;WDR14;WDVCF;DGCRK3;KIAA1645
1,59	0,005042721	NM_031420.2	MRPL9	L9mt
35 1,50	0,005137737	NM_003926.5	MBD3	
-1,42	0,006569589	NM_016575.1	TU12B1-TY	
1,62	0,009179039	NM_016948.1	PARD6A	PAR-6;TAX40;PAR-6A;TIP-40;PAR6alpha
-1,77	0,009238875	NM_013333.2	EPN1	
-1,85	0,011214848	NM_000700.1	ANXA1	ANX1;LPC1
40 -2,98	0,012258881	NM_000518.4	HBB	
-1,42	0,018829774	NM_005115.3	MVP	LRP;VAULT1
-1,81	0,020051909	NM_002863.2	PYGL	
1,41	0,020051909	NM_024734.2	CLMN	calmin;FLJ12383;KIAA1188
45 -1,66	0,020051909	NM_006483.1	DYRK1B	MIRK
1,66	0,022202324	NM_005001.1	NDUFA7	B14.5a
1,81	0,02440468	NM_152312.2	GYLTL1B	FLJ35207
1,39	0,02440468	NM_153188.1	TNPO1	MIP;TRN;IPO2;MIP1;KPNB2
-1,63	0,025247943	NM_002339.1	LSP1	WP34;pp52
50 -1,37	0,026585392	NM_053276.2	VIT	
-1,85	0,026726011	NM_005566.1	LDHA	LDHI
-1,53	0,02724486	NM_002502.2	NFKB2	LYT10;LYT-10
1,69	0,031332618	NM_033419.3	CAB2	PP1498;AGLA546;MGC9753
-1,42	0,033641657	NM_012447.1	STAG3	MGC2463
55 -1,54	0,033641657	NM_138392.1	LOC92799	
-1,44	0,041259852	NM_198495.1	FLJ43692	
-1,34	0,04281618	XM_292049.3	LOC341416	
1,52	0,04281618	NM_015568.2	PPP1R16B	TIMAP;ANKRD4;KIAA0823
60 1,39	0,043017515	NM_004436.1	ENSA	
1,51	0,046241371	NM_145012.3	C10orf9	CFP1;CBCP1
1,42	0,046826639	NM_017980.2	LIMS2	PINCH-2;FLJ10044

65

ES 2 351 456 A1

TABLA 2

Listado de genes diferencialmente expresados en células CD4+T (Linfocitos T-CD4) en pacientes con AR respondedores a la terapia con rituximab vs pacientes no respondedores. Los genes sombreados son los que presentaron mayor significación estadística

5

	Nivel de Expresión	P (significación estadística)	Nº Acceso NCBI	Símbolo	Símbolos sinónimos
	1,37	5,16E-13	NM_138557.1	TLR4	TOLL;hToll
10	-1,48	4,54E-10	NM_138342.2	LOC89944	
	1,38	5,95E-07	NM_005486.1	TOMIL1	SRASM
	-1,50	1,33E-05	NM_181866.1	BACH	ACT;ACH1;LACH1;hBACH;CTE-II;MGC1126
	-1,47	5,33E-05	NM_032041.1	NCAID	
15	-1,68	0,000101326	NM_012154.2	EIF2C2	Q10;AGO2;MGC3183
	-1,69	0,000549477	NM_005597.2	NFIC	CTF;NF1;CTF5;NF-EMGC20153
	1,35	0,000566469	NM_018940.2	PCDHB7	PCDH-BETA7
	1,34	0,000652274	NM_182525.1	FLJ32770	
	1,32	0,003712105	NM_004432.1	ELAVL2	HUB;HELNI;HEL-N1
20	1,99	0,003712105	XM_065237.5	LOC129439	
	-1,64	0,003712105	NM_130783.2	LOC90139	TSPAN
	1,38	0,008059177	NM_000818.1	GAD2	GAD65
	1,40	0,008427	NM_007160.2	OR2H3	FAT11;OLFR2
	1,54	0,008427	NM_005611.2	RBL2	Rb2;P130
25	-1,31	0,008427	NM_031274.2	TEX13A	
	1,31	0,010149379	NM_032854.1	FLJ14871	
	-1,36	0,01223528	NM_021622.2	PLEKHA1	TAPPI
	1,48	0,019282522	NM_002227.1	JAK1	JAK1A
	1,47	0,019323333	NM_000801.2	FKBP1A	FKBP1;PKC12;PKC12;FKBP12;PPIASE;FKBP-12;FKBP12C
30	-1,43	0,021500376	NM_022070.3	ABC1	FLJ22087
	-1,33	0,021500376	NM_032788.1	ZNF514	FLJ14457
	-1,61	0,022435284	NM_003403.3	YY1	DELTA;NF-E1;UCRBP;YIN-YANG-1
	1,41	0,02504827	NM_017585.2	SLC2A6	GLUT6;GLUT9;HSA011372
	1,42	0,02504827	NM_174943.2	FLJ25976	
35	1,32	0,028705236	NM_004543.2	NEB	NEM2
	1,33	0,030870305	NM_198945.1	ALS2CR17	
	-1,32	0,030870305	NM_144490.1	AKAP11	PRKA11;AKAP220;FLJ11304;KIAA0629
	-1,52	0,033230235	NM_017668.1	NDE1	NUDE;NUDE1;FLJ20101
40	1,40	0,035705721	NM_001970.3	EIF5A	EIF-5A;EIF5A1
	-1,53	0,038879229	NM_015897.2	PIASY	MGC35296
	-1,48	0,039069694	NM_002168.2	IDH2	IDH;IDP;IDHM;ICD-M;nmNADP-IDH
	1,28	0,04545963	NM_022337.1	RAB38	NY-MEL-1

45

TABLA 3

Listado de genes diferencialmente expresados en células de la sangre total en pacientes con AR respondedores a la terapia con rituximab vs pacientes no respondedores

50

	Nivel de Expresión	P (significación estadística)	Nº Acceso NCBI	Símbolo	Símbolo sinónimo
55	-1,56	3,06E-17	NM_000045.2	ARG1	
	-1,52	7,72E-07	NM_001304.3	CPD	
	1,44	0,017986457	NM_005658.2	TRAF1	EBI6;MGC:10353
	-1,47	0,022919791	NM_015991.1	C1QA	
60	1,56	0,022919791	NM_018334.3	LRRN3	NLRR3;NLRR-3;FLJ11129
	-2,48	0,022919791	XM_371812.1	HLA-DQA1	DQA1;HLA-DQ;CELIAC1;HLA-DQA
	1,36	0,031396183	NM_016231.2	NLK	

65

Los genes ARG1, TRAF1, TLR4 y ARID3A fueron analizados mediante RT-PCR.

ES 2 351 456 A1

Todos los genes citados en las Tablas 1 a 3 son estadísticamente significativos y por lo tanto cada uno de ellos puede ser eficazmente empleado en el método de la invención. Sin embargo, los genes que aparecen sombreados forman parte de un aspecto preferido de la invención puesto que son los genes que presentaron mayor significación estadística.

5

Tal y como muestra las Tablas 1 a 3, en la sangre total se identificaron un grupo de siete genes diferencialmente expresados entre pacientes respondedores a la terapia con rituximab vs pacientes no respondedores. Además se presentan los genes con mayor significación estadística expresados en células CD4+T y B, diferencialmente expresados entre pacientes respondedores a la terapia con rituximab vs pacientes no respondedores ($P < 0.0001$, $n = 9$ $n = 7$, respectivamente).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Método *in vitro* para el pronóstico o predicción de la respuesta al tratamiento con agentes que reconocen el receptor de membrana CD20 de los linfocitos B por parte de pacientes con artritis reumatoide, que comprende la determinación en una muestra de células sanguíneas de dichos pacientes del nivel de expresión de al menos uno, de cualquier combinación o de la totalidad de los genes seleccionados del grupo: ARG1, CPD, TRAF1, C1QA, LRRN3, HLA-DQA1, NLK, TLR4, LOC89944, TOM1L1, BACH, NCALD, EIF2C2, NFIC, PCDHB7, FLJ32770, ARID3A, C14orf9, CSNK1E, BCAS1, TEAD2, C6orf145 y SNTA1; y la comparación de dicho nivel de expresión con respecto a los valores de expresión obtenidos de pacientes respondedores al tratamiento y no respondedores al mismo.

10 2. Método *in vitro*, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la determinación del nivel de expresión de los genes ARG1, CPD, TRAF1, C1QA, LRRN3, HLA-DQA1 y NLK se realiza en muestras de sangre total.

15 3. Método, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el pronóstico se realiza atendiendo al valor de expresión obtenido del ratio ARG1/TRAF1, sin necesidad de comparar el valor del ratio con respecto a los valores de expresión obtenidos de pacientes respondedores al tratamiento y no respondedores al mismo, donde un ratio ARG1/TRAF1 positivo predice de forma directa que los pacientes no responderán al tratamiento y un ratio ARG1/TRAF1 negativo predice de forma directa que los pacientes responderán al tratamiento.

20 4. Método *in vitro*, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la determinación del nivel de expresión de los genes TLR4, LOC89944, TOM1L1, BACH, NCALD, EIF2C2, NFIC, PCDHB7 y FLJ32770 se realiza en células CD4+T.

25 5. Método *in vitro*, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la determinación del nivel de expresión de los genes ARID3A, C14ORF9, CSNK1E, BCAS1, TEAD2, C6orf145 y SNTA1 se realiza en células B.

30 6. Método *in vitro*, según la reivindicación 1, que comprende la determinación del nivel de expresión del conjunto de genes: ARG1, TRAF1, TLR4 y ARID3A.

35 7. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, **caracterizado** porque los genes TRAF1, LRRN3 y NLK están sobre-expresados en sangre total, el grupo de genes TLR4, TOM1L1, PCDHB7 y FLJ32770 están sobre-expresados en células CD4+T y el grupo de genes C14ORF9, CSNK1E, BCAS1, TEAD2, C6orf145 y SNTA1 están sobre-expresados en células B; en pacientes respondedores antes de iniciar el tratamiento.

40 8. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, **caracterizado** porque los genes ARG1, CPD, C1QA y HLA-DQA1 están infra-expresados en sangre total, el grupo de genes LOC89944, BACH, NCALD, EIF2C2 y NFIC están infra-expresados en células CD4+T y el gen ARID3A están infra-expresados en células B; en pacientes respondedores antes de iniciar el tratamiento.

45 9. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, **caracterizado** porque el nivel de expresión de los genes es determinado mediante la cuantificación del nivel de ARNm en la muestra de células sanguíneas.

50 10. Método *in vitro*, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el agente que reconoce el receptor de membrana CD20 de los linfocitos B es rituximab.

50

55

60

65

FIGURA 1

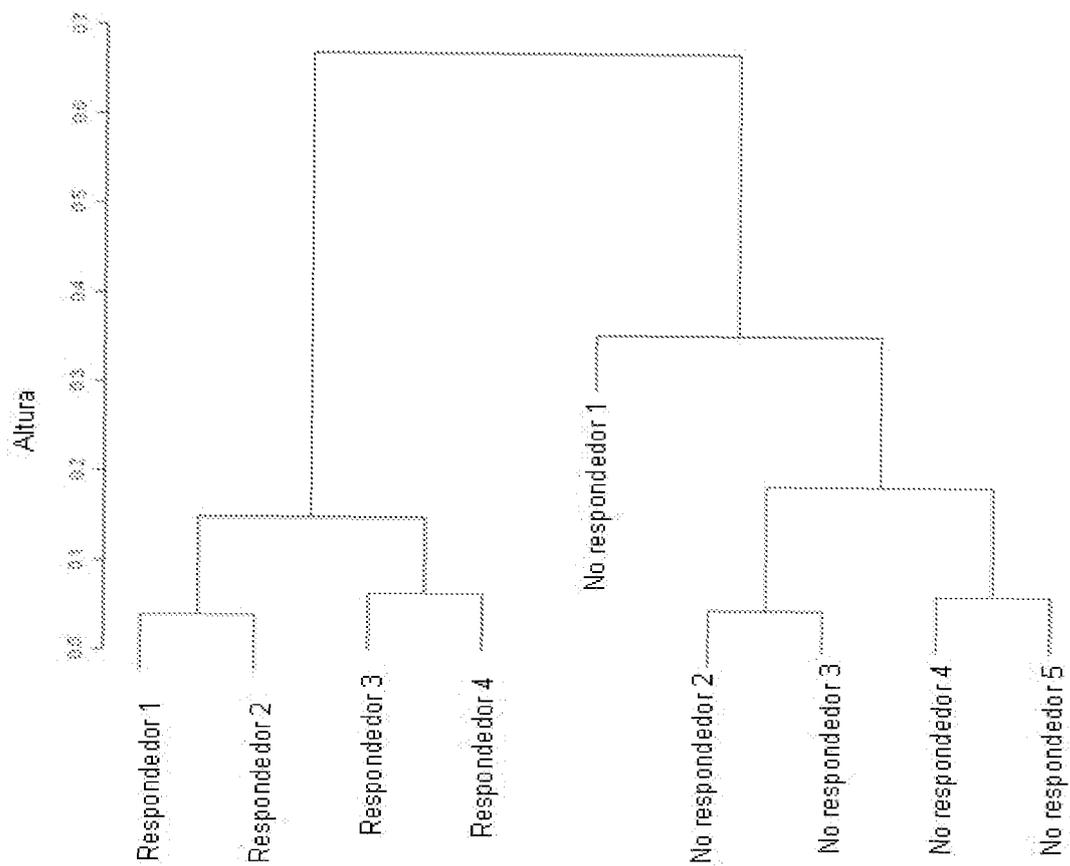


FIGURA 2

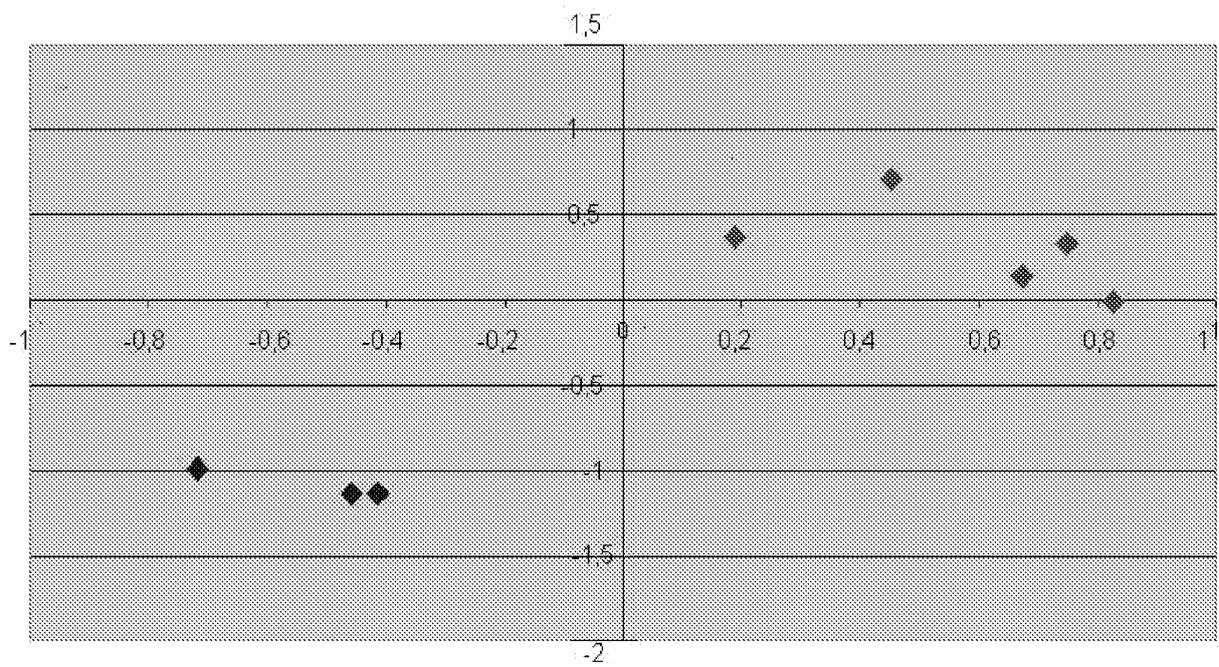
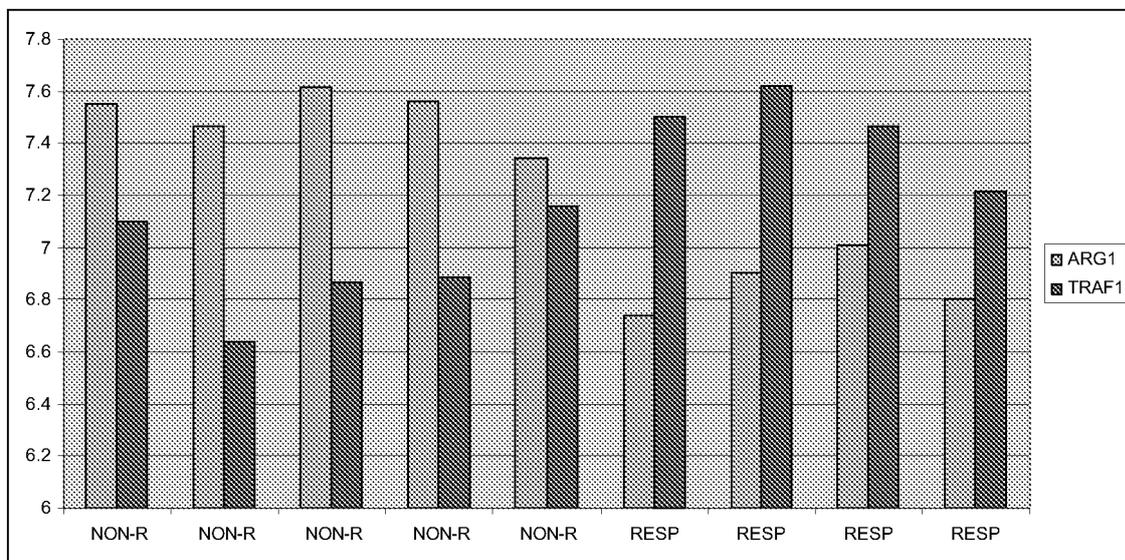


FIGURA 3





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N.º solicitud: 200930349

② Fecha de presentación de la solicitud: **24.06.2009**

③ Fecha de prioridad: **00-00-0000**
00-00-0000
00-00-0000

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	TOONEN, E.J.M., et al. Gene expression profiling in rheumatoid arthritis: current concepts and future directions. Annals of the rheumatic diseases. Dic-2008. Vol. 67, nº 12, páginas 1663-1669. ISSN 1468-2060 (Electrónico). Ver todo el documento.	1-10
A	LEQUERRÉ, T., et al. Gene profiling in white blood cells predicts infliximab responsiveness in rheumatoid arthritis. Arthritis research and therapy. 03-07-2006. Vol. 8, nº 4, página R105. ISSN 1478-6354. Ver todo el documento.	1-10
A	SEKIGUCHI, N, et al. Messenger ribonucleic acid expression profile in peripheral blood cells from RA patients following treatment with an anti-TNF-alpha monoclonal antibody, infliximab. Rheumatology (Oxford). Jun-2008. Vol. 47, nº 6, páginas 780-788. ISSN 1462-0324. Ver todo el documento.	1-10
A	KOCZAN, D., et al. Molecular discrimination of responders and nonresponders to anti-TNF alpha therapy in rheumatoid arthritis by etanercept. Arthritis research and therapy. 02-05-2008. Vol. 10, nº 3, página R50. ISSN 1478-6362 (Electrónico). Ver todo el documento.	1-10

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
11.08.2010

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

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

C12Q, C12N, 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, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, GEO Profiles, GenBank.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.08.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SÍ NO
	Reivindicaciones _____	
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SÍ NO
	Reivindicaciones _____	

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	TOONEN, E.J.M., et al.	Dic-2008
D02	LEQUERRÉ, T., et al.	03.07.2006
D03	SEKIGUCHI, N, et al.	Jun-2008
D04	KOCZAN, D., et al.	02.05.2008

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 de patente describe un método para pronosticar o predecir, in vitro, la respuesta de pacientes con artritis reumatoide al tratamiento con agentes que reconocen el receptor de membrana CD20 de los linfocitos B, concretamente, al tratamiento con rituximab. El método consiste en la determinación en muestras de sangre total, de células CD4+T, o de células B, de la expresión uno o varios de los genes del grupo de ARG1, CPD, TRAF1, C1QA, LRRN3, HLA-DQA1, NLK, TLR4, LOC89944, TOM1L1, BACH, NCALD, EIF2C2, NFIC, PCDHB7, FLJ32770, ARID3A, C14orf9, CSNK1E, BCAS1, TEAD2, C6orf145 y SNTA1. En la solicitud se establece una clara relación entre el aumento o disminución de la expresión de cada uno de estos genes y la respuesta positiva o negativa al tratamiento.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue un método de pronóstico de la respuesta terapéutica de pacientes con artritis reumatoide que esté basado en las medidas de los niveles de expresión de estos genes, por lo que la solicitud cumple el requisito de novedad según el artículo 6 de la Ley de Patentes.

Los documentos del estado de la técnica que se consideran más cercanos a la solicitud divulgan métodos para predecir la respuesta de pacientes con artritis reumatoide a diversos tratamientos. Igual que la solicitud, los métodos encontrados utilizan los valores de la expresión de determinados genes para determinar si el paciente responderá o no al tratamiento. En ningún caso se estudia la respuesta a rituximab ni a otros agentes que reconocen el receptor de membrana CD20, y ninguno de los genes reivindicados en la solicitud se emplea en los métodos divulgados en los documentos del estado de la técnica, por lo que la presente solicitud tiene actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

Los documentos que se comentan a continuación son los que se consideran más cercanos a la solicitud, aunque ninguno de ellos afecta la novedad ni la actividad inventiva de la misma.

Así, el documento D01 es una revisión de varios estudios realizados en pacientes con artritis reumatoide, que se basan en el análisis de los perfiles de expresión génica obtenidos por la técnica de microarrays, y cuyos resultados se emplean para diagnosticar o predecir la capacidad de respuesta al tratamiento de la enfermedad con distintos fármacos. En este documento se cita, entre otros, el trabajo descrito en el documento D02, que consiste en el estudio de la expresión génica en muestras de sangre de los pacientes antes de iniciar el tratamiento con infliximab, un agente bloqueante del factor de necrosis tumoral (TNF) que se emplea en el tratamiento de la artritis reumatoide. El método permite predecir la eficacia del fármaco en cada paciente mediante el estudio de un pequeño número de transcritos y, de este modo determinar si se debe emplear ese tratamiento o uno alternativo.

El documento D03 es un estudio semejante al realizado en D02, pero más actual, en el que también se determina un grupo de genes que presentan expresión diferencial entre los pacientes que responden a infliximab y los que no lo hacen. De nuevo, se sugiere el análisis personalizado de la expresión génica en pacientes con artritis reumatoide como herramienta para determinar la capacidad de respuesta al tratamiento.

Finalmente, en el documento D04 el estudio de la expresión génica diferencial se emplea para predecir la respuesta al tratamiento con etanercept, otro bloqueante de TNF, en pacientes con artritis reumatoide. En este caso, los autores determinan grupos de 2 y 3 genes cuyo nivel de expresión varía entre pacientes respondedores y no-respondedores, y que, por tanto, son útiles para determinar la utilidad del tratamiento de la enfermedad con etanercept.