



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 566**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04765831 .5**

96 Fecha de presentación : **05.10.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1673473**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.06.2006**

54 Título: **Uso de polimorfismos genéticos que se asocian con la eficacia del tratamiento de una enfermedad inflamatoria.**

30 Prioridad: **06.10.2003 US 508971 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.11.2011

73 Titular/es: **NOVARTIS AG.**
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH
NOVARTIS PHARMA GmbH

72 Inventor/es: **Ide, Susan;**
Lavedan, Christian, Nicolas y
McCullough, Karen

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 367 566 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de polimorfismos genéticos que se asocian con la eficacia del tratamiento de una enfermedad inflamatoria

Campo de la invención

5 Esta divulgación se relaciona en general con los ensayos analíticos de muestras de tejido *in vitro*, y más particularmente con el análisis de polimorfismos genéticos como biomarcadores para la eficacia de tratamientos de enfermedades inflamatorias.

Descripción del estado del arte relacionado

10 La dermatitis atópica (AD), también conocida como eczema, es una enfermedad inflamatoria de la piel caracterizada por piel inflamada con comezón que se presenta durante la infancia y la niñez. La enfermedad es uno de los trastornos dermatológicos más comunes en los países occidentales, afectando a más el 20% de los niños de menos de cinco años. Cookson WO et al., Nature Genetics 27: 372 - 373 (2001).

15 Pimecrolimus (Elidel®) es un derivado de la macrolactama ascomicina que fue específicamente desarrollada para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel. Tacrolimus (FK506; Protopic® o Prograf®) es un miembro de la misma clase de compuestos y es también utilizado para tratar enfermedades inflamatorias de la piel. Tanto pimecrolimus como tacrolimus interfieren con el proceso inflamatorio por medio del enlazamiento de alta afinidad con macrofilina-12 e inhibiendo la calcineurina, que bloquea la transcripción de citoquinas tipo Th1 y Th2 en linfocitos T. Aunque los dos compuestos son estructuralmente similares y tienen mecanismos comparables de acción, pimecrolimus tiene una mayor afinidad por la piel que tacrolimus.

20 Desde hace tiempo se reconoce que existe una base genética para enfermedades atópicas. Se han hecho diferentes análisis relacionados para definir regiones de susceptibilidad que contribuyen a la dermatitis atópica, como se ha estudiado en Maclean J. A. & Eidelman F. J., Arch Dermatol 137: 1474 - 1476 (2001). Al menos cinco regiones cromosómicas (3q21, 5q31-33, 11q13, 13q12-14 y 14q11.2) se cree que contienen loci de susceptibilidad a la dermatitis atópica. Actualmente se cree que mecanismos atópicos son los principales responsables por la patogénesis de la dermatitis atópica. Sin embargo, otros genes involucrados con inflamación dérmica pueden contribuir también a la condición. Cookson WO et al., Nature Genetics 27: 372 - 373 (2001).

25 La tasa de respuesta entre pacientes que toman macrolactamas tópicas (pimecrolimus o tacrolimus) es actualmente menor al 50%. No se sabe por qué algunos pacientes no responden a estos medicamentos. Por lo tanto, subsiste la necesidad en el estado del arte de mejorar la eficacia de las macrolactamas tópicas, por ejemplo dirigiendo formulaciones apropiadas de los medicamentos a aquellos pacientes con enfermedades inflamatorias que estén genéticamente predispuestos a responder y beneficiarse del tratamiento.

Resumen de la invención

35 La divulgación provee un método para tratar la dermatitis atópica, con base en la determinación de los alelos del *TNF* de pacientes. En una modalidad, se analizan los pacientes por la presencia de un polimorfismo del *TNF* (-1031) para determinar qué terapia es la apropiada. Los pacientes que tienen los alelos TT (SEQ ID NO: 1) en ese locus son tratados con pimecrolimus en crema o ungüento, mientras que los pacientes que tienen los alelos CC (SEQ ID NO: 2) o los alelos CT (SEQ ID NOS: 1 y 2) son tratados con una dosis mayor de pimecrolimus en crema, con pimecrolimus en crema más otro fármaco antiinflamatorio, o como un fármaco antiinflamatorio sin pimecrolimus en crema.

40 La divulgación también provee un método general para tratar la psoriasis, asma, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide o cualquier trastorno para el cual está indicado pimecrolimus (oral, tópico u otro), con base en una determinación de los alelos *TNF* del paciente. En una modalidad, se analizan los pacientes por la presencia de un polimorfismo del *TNF* (-1031) para determinar qué terapia es la apropiada. Los pacientes con alelos TT en ese locus son tratados con pimecrolimus, mientras que los pacientes con alelos CC y alelos CT son tratados con una dosis mayor de pimecrolimus, pimecrolimus más otro fármaco antiinflamatorio o un fármaco antiinflamatorio sin pimecrolimus.

45 La divulgación provee además un método para tratar psoriasis, asma, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide o cualquier trastorno para el cual está indicado pimecrolimus (oral, tópico u otro), con base en una determinación de los alelos *LTA*. En una modalidad, los pacientes son analizados por la presencia de un polimorfismo del locus de ASN60THR *LTA* para determinar qué terapia es la apropiada. Los pacientes con alelos AA (SEQ ID NO: 3) o alelos AC (SEQ ID NOS: 3 y 4) en ese locus son tratados con pimecrolimus, mientras que los

pacientes con alelos *CCR2* (SEQ ID NO: 4) reciben una dosis mayor de pimecrolimus, pimecrolimus más otro fármaco antiinflamatorio o un fármaco antiinflamatorio sin pimecrolimus.

5 La divulgación también provee un método para tratar psoriasis, asma, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide o cualquier trastorno para el cual es indicado tacrolimus (oral, tópico o otro), con base en la determinación de los alelos *CCR2* del paciente. En una modalidad, se analizan los pacientes por la presencia de un polimorfismo del locus VAL64ILECCR2 para determinar que terapia es apropiada. Los pacientes con alelos GG (SEQ ID NO: 5) en ese locus son tratados con tacrolimus, mientras que los pacientes con alelos AG (SEQ ID NOS: 5 y 6) reciben una dosis mayor de tacrolimus, tacrolimus más otro fármaco antiinflamatorio o un fármaco antiinflamatorio sin tacrolimus.

10 La divulgación provee un método para el tratamiento de la dermatitis atópica o cualquier trastorno para el cual es indicado el pimecrolimus (oral, tópico u otro), en donde se mide el nivel de proteína del TNF- α o el ARNm presente en el paciente antes de determinar qué terapia es la apropiada. En una modalidad, cuando los niveles de proteína del TNF- α o de ARNm en los fluidos corporales o muestras de tejido no inflamado del paciente son bajos o normales, entonces el paciente es tratado con pimecrolimus. En otra modalidad, cuando los niveles de proteína del TNF- α o de ARNm son elevados, entonces el paciente es tratado con pimecrolimus en combinación con otro fármaco antiinflamatorio o con terapia alternativa.

20 La divulgación provee un método para determinar una estrategia de tratamiento para una condición en un individuo, en donde la condición es seleccionada del grupo que consiste de dermatitis atópica, psoriasis, asma, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide u otra condición para la cual es indicado pimecrolimus, dicho método comprende el análisis del nivel de ARNm del TNF- α o de proteína del TNF- α en una muestra obtenida del individuo; y en donde la estrategia de tratamiento comprende la selección de una formulación de pimecrolimus como tratamiento cuando el nivel de ARNm del TNF- α o de proteína del TNF- α en la muestra es bajo o normal; o la selección ya sea de (A) una formulación de pimecrolimus en combinación con otro inmunosupresor u (B) otro inmunosupresor como tratamiento cuando el nivel del ARNm del TNF- α o de proteína del TNF- α en la muestra es elevado. Preferiblemente, se toma la muestra de un tejido no inflamado.

La divulgación provee un método para escoger individuos para inclusión en un ensayo clínico de una enfermedad inflamatoria de la piel o cualquier otro trastorno adecuado es indicado pimecrolimus, donde los polimorfismos genéticos en el locus del TNF (-1031), el locus de la *LTA* de ASN60THR o el locus de VAL64ILECCR2 de los individuos candidatos son interrogados antes de la inclusión en el ensayo clínico.

30 La divulgación provee un kit para uso en la determinación de la estrategia de tratamiento para un paciente con enfermedad inflamatoria de la piel o cualquier otro trastorno para el cual es indicado pimecrolimus. En una modalidad, el kit contiene reactivos para determinar los niveles de proteína del TNF- α o de ARNm en una muestra obtenida de un individuo que va a ser tratado. En otra modalidad, el kit contiene reactivos para determinar el genotipo del individuo en los genes *TNF*, *LTA* o *CCR2*. El kit también contiene un producto escrito que describe el uso del biomarcador en la determinación de una estrategia de tratamiento para la condición.

40 La divulgación provee además un método para determinar una estrategia de tratamiento para una condición en un individuo, en donde la condición es seleccionada del grupo que consiste de dermatitis atópica, psoriasis, asma, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide u otra condición para la cual es indicada pimecrolimus o tacrolimus, dicho método comprende el análisis del genotipo de un individuo en un locus genético del grupo de genes para el TNF indicativo de la eficacia de una formulación seleccionada de macrolactama en el tratamiento de la condición. Preferiblemente, se determina el genotipo analizando una muestra obtenida de dicho individuo. En una modalidad, se analizan individuos/ pacientes por la presencia de un polimorfismo del *TNF* (-1031) para determinar la estrategia apropiada de tratamiento. Para pacientes con alelos TT (SEQ ID NO: 1) en ese locus se selecciona pimecrolimus como tratamiento, mientras que para pacientes con alelos CC (SEQ ID NO: 2) y alelos CT (SEQ ID NOS: 1 y 2) se selecciona como tratamiento una dosis mayor de pimecrolimus, pimecrolimus más otro fármaco antiinflamatorio un fármaco antiinflamatorio sin pimecrolimus. Otra modalidad prevé que dicha estrategia de tratamiento se base en la determinación de los alelos *LTA* del paciente. En una modalidad preferida, se analizan los pacientes por la presencia de un polimorfismo del locus *LTA* de ASN60THR para determinar la estrategia de tratamiento. Para pacientes con alelos AA (SEQ ID NO: 3) o alelos AC (SEQ ID NOS: 3 y 4) en ese locus se selecciona pimecrolimus como tratamiento, mientras que para pacientes con alelos CC (SEQ ID NO: 4) se selecciona como tratamiento una dosis mayor de pimecrolimus, pimecrolimus más otro fármaco antiinflamatorio o un fármaco antiinflamatorio sin pimecrolimus. Preferiblemente se selecciona el fármaco antiinflamatorio del grupo que consiste de hidrocortisona, ciclosporina, tacrolimus y sirolimus.

55 La divulgación provee un método adicional para determinar una estrategia de tratamiento para un individuo / paciente afectado por dermatitis atópica, psoriasis, asma, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide u otra condición para la cual se indica pimecrolimus o tacrolimus, con base en la determinación de los alelos *CCR2* del paciente. En una modalidad, el paciente es analizado por la presencia de un polimorfismo del locus de *CCR2*

5 VAL64ILE para determinar la estrategia apropiada de tratamiento. Para un paciente con el alelo GG (SEQ ID NO: 5) en ese locus se selecciona tacrolimus como estrategia de tratamiento, mientras que para un paciente con el alelo AG (SEQ ID NOS: 5 y 6) se selecciona como estrategia tratamiento una dosis más alta de tacrolimus, tacrolimus más otro fármaco antiinflamatorio o un fármaco antiinflamatorio sin tacrolimus. El fármaco antiinflamatorio es seleccionado preferiblemente del grupo que consiste de hidrocortisona, ciclosporina, pimecrolimus y sirolimus.

10 La divulgación también prevé el uso de pimecrolimus en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en una población seleccionada de pacientes, en donde la población de pacientes es seleccionada con base en el genotipo de los pacientes en un locus genético del grupo de genes para el TNF indicativo de la eficacia del pimecrolimus en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria. En una modalidad, el genotipo de la población seleccionada de pacientes incluye la presencia de un polimorfismo del *TNF* (-1031). Preferiblemente, la población seleccionada de pacientes incluye alelos TT en ese locus. En otra modalidad, la población seleccionada de pacientes incluye un polimorfismo del locus de *LTA* ASN60THR. Preferiblemente, la población seleccionada de pacientes incluye alelos AA o alelos AC en ese locus.

15 Además, la divulgación prevé el uso de tacrolimus en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en una población seleccionada de pacientes, en donde la población de pacientes se selecciona con base en el genotipo de los pacientes en el locus genético *CCR2* indicativo de la eficacia de tacrolimus en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria. En una modalidad, la población seleccionada de pacientes incluye al polimorfismo del locus de *CCR2* VAL64ILE. Preferiblemente, dicha población de pacientes incluye los alelos GG en ese locus.

20 La invención también provee una forma de mejorar la eficacia de macrolactamas tópicas, particularmente pimecrolimus, por medio de la identificación de biomarcadores de la eficacia en los individuos que va a ser tratados y luego dirigir formulaciones apropiadas de macrolactama a aquellos que son más capaces de responder y beneficiarse de tratamiento. Esta invención está definida en las reivindicaciones anexas.

Breve descripción de los dibujos

25 La FIG. 1 es una representación esquemática del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) sobre el cromosoma (Ch) 6 que muestran el lugar de *LTA* (gen que codifica para linfotoxina alfa) y *TNF* (gen que codifica para el factor de necrosis tumoral alfa; TNF- α) dentro del MHC. Más abajo se muestra en mayor la región de 6p21.3 que contiene al grupo de genes para *TNF*. * denota los polimorfismos, que están más o menos separados 2.5 kb, discutidos aquí. Esta figura es modificada de Field M, Q J Med 94: 237 - 246 (2001).

30 Descripción de las modalidades preferidas

La eficacia del tratamiento de la dermatitis atópica por parte de pimecrolimus en crema al 1%, pero sin tratamiento con tacrolimus en ungüento al 0,03%, está asociada con marcadores polimórficos en el grupo de *TNF* sobre 6p21.3. Este descubrimiento proporciona una forma para utilizar polimorfismos genéticos que se asocian con eficacia del tratamiento con pimecrolimus en la determinación del tratamiento más efectivo.

35 Se identificó el locus genético en un ensayo de Fase IIIb que fue diseñado como una comparación directa de pimecrolimus en crema al 1% y tacrolimus en ungüento al 0,03%. El ensayo de seis semanas ciego para el investigador de individuos pediátricos con dermatitis atópica moderada exploró la incidencia de reacciones locales en el sitio de la aplicación inducidas por las dos macrolactamas tópicas, así como su eficacia, seguridad y aceptabilidad cosmética. Las muestras de sangre para análisis farmacogenético fueron recolectadas de participantes
40 que dieron su consentimiento en el ensayo clínico, para definir una base genética para responder a cualquiera de los tratamientos.

Entre estos genes seleccionados para análisis farmacogenómico estaban *LTA*, que codifica para linfotoxina alfa (LT α), y *TNF*, que codifica para el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Los genes *LTA* y *TNF* están localizados
45 en tándem en la región MHCIII rica en genes de 6p21.3 (ver, la FIG. 1). Ambos genes contienen múltiples polimorfismos, algunos de los cuales han sido bien caracterizados, como lo revisado por Field M, Q J Med 94: 237 - 246 (2001). Tanto los productos génicos de *LTA* como de *TNF* son citoquinas involucradas en procesos inflamatorios. Ambas citoquinas señalan a través de receptores del TNF- α , que se expresan en muchos tejidos diferentes, incluida la piel. Rulls S. R. & Sedgwick J. D., Am J Hum Genet 65: 294 - 301 (1999). Además, tanto *LTA* como *TNF* han sido implicados en la patogénesis de una enfermedad atópica. Los polimorfismos en ambos genes
50 están asociados con atopía, particularmente asma. Trabetti E et al., J Med Genet 36: 323 - 5 (1999); Izakovicaova Holla L et al., Clin Exp Allergy 9: 1418 - 23 (2001); Castro J et al., J Investig Allergol Clin Immunol 3: 149 - 5 (2000); Li Kam Wa T. C. et al., Clin Exp Allergy 29: 1204 - 8 (1999); y Zhu S et al. Am J Respir Crit Care Med 161: 1655 - 9 (2000). TNF- α ha sido ampliamente estudiado por su papel en la inflamación dérmica. Tanto los mastocitos dérmicos como los queratinocitos producen TNF- α . Aunque la expresión del TNF- α es constitutiva en la piel, el nivel de
55 expresión puede ser inducido adicionalmente por medio de una variedad de estímulos. Los niveles del TNF- α son

elevados en lesiones de la piel producidas por la psoriasis, y diferentes reportes han sugerido que los fármacos que modulan la función del TNF- α son efectivos en el tratamiento de la psoriasis, de acuerdo a las observaciones hechas por LaDuca J. R. & Gaspari A. A., *Dermatol Clin* 19: 617 - 635 (2001) y Mease P. J., *Ann Rheum Dis* 61: 298 - 304 (2002). Aunque la psoriasis es distinta de la dermatitis atópica, la expresión de ambas enfermedades está influenciada por genes que modulan la inflamación dérmica. Cookson WO et al., *Nature Genetics* 27: 372 - 373 (2001).

En el ensayo clínico y posterior análisis farmacogenómico, se encontró una asociación entre la eficacia del pimecrolimus y el polimorfismo del *TNF* (-1031) en individuos pediátricos (2 - 17 años de edad) con dermatitis atópica quienes fueron tratados tópicamente con la formulación en crema de pimecrolimus. El polimorfismo que se asoció con la eficacia del pimecrolimus está localizado -1031 del sitio de inicio de la transcripción del gen y cambia la T de tipo silvestre por una C. Los únicos individuos que experimentaron eficacia en este ensayo tenían un genotipo TT en el *TNF* (-1031) (SEQ ID NO: 1). Ningún paciente con un alelo C (CC (SEQ ID NO: 2) o CT (SEQ ID NOS: 1 y 2)) en ese locus respondió al pimecrolimus. Esta asociación no se mantuvo para tacrolimus.

Para un segundo SNP en la misma región cromosómica, ASN60THR *LTA*, los datos también sugirieron una tendencia significativa.

No se puede esperar razonablemente que estas asociaciones se mantengan para todos los grupos de edad y para individuos con otras enfermedades inflamatorias de la piel. Además, la eficacia del pimecrolimus puede ser razonablemente predicha cuando se formula el compuesto como una tableta o un aerosol. El método puede ser utilizado para individuos vertebrados, particularmente individuos mamíferos y más particularmente para individuos humanos.

Los individuos que portan alelos polimórficos de interés (es decir, en genes del grupo del *TNF*, tales como *TNF* y *LTA*) pueden ser detectados en el ADN, el ARN, o el nivel de proteína utilizando una variedad de técnicas que son bien conocidas en arte. Las estrategias para la identificación y detección están descritas por ejemplo en EP 730.663, EP 717.113, y PCT US97/02102. Los métodos pueden involucrar la detección de polimorfismos previamente caracterizados, donde la localización y naturaleza del genotipado de formas polimórficas presentes en un sitio ya han sido determinadas (ver, la discusión anterior en relación con los genes *LTA* y *TNF*). La disponibilidad de esta información permite diseñar grupos de sondas para identificación específica de formas polimórficas conocidas. La identificación de alelos que contienen polimorfismos de un solo nucleótido puede involucrar la amplificación del ADN de muestras objetivo. Esto puede ser logrado por ejemplo por medio de la PCR. Ver generalmente PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, (ed. Erlich, Freeman Press, NY, N.Y., 1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (eds. Innis, et al., Academic Press, San Diego, Calif., 1990). La detección de polimorfismos en secuencias específicas de ADN, puede ser lograda por medio de una variedad de métodos que incluyen, pero no se limitan a, detección de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción con base en la escisión por medio de una endonucleasa de restricción específica del alelo (Kan & Dozy, *Lancet* II: 910 - 912 (1978)), hibridación con sondas de oligonucleótidos específicas del alelo (Wallace et al, *Nucl. Acids Res.* 6: 3543 - 3557 (1978)), incluidos oligonucleótidos inmovilizados (Saiki et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 6230 - 6234 (1969)) o arreglos de oligonucleótidos (Maskos & Southern, *Nucl. Acids Res.* 21: 2269 - 2270 (1993)), PCR específica del alelo (Newton et al., *Nucl. Acids Res.* 17: 2503 - 2516 (1989)), detección de reparación errónea (MRD) (Faham & Cox, *Genome Res.* 5: 474 - 482 (1995)), enlazamiento de proteína MutS (Wagner et al., *Nucl. Acids Res.* 23: 3944 - 3948 (1995)), electroforesis en gel de gradiente de desnaturalización (DGGE) (Fisher & Lerman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 1579 - 1583 (1983)), detección de polimorfismo de conformación monocatenaria (Orita et al., *Genomics* 5: 874 - 879 (1983)), escisión por ARNasa en pares de bases desapareadas (Myers et al., *Science* 230: 1242 (1985)), escisión química (Cotton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 8Z: 4397 - 4401 (1988)) o enzimática (Youil et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 87 - 91 (1995)) de ADN heterodúplex, métodos basados en extensión del iniciador específico del alelo (Syvanen et al., *Genomics* 8: 684 - 692 (1990)), análisis genético de bits (GBA) (Nikiforov et al., *Nucl. Acids Res.* 22: 4167 - 4175 (1994)), el ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA) (Landegren et al., *Science* 241: 1077 (1988)), la reacción en cadena para ligación específica de alelos (LCR) (Barrany, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 189 - 193 (1991)), gap-LCR (Abravaya et al., *Nucl. Acids Res.* 23: 675 - 682 (1995)), secuenciación de ADN fluorescente y/o radioactivo utilizando procedimientos estándar bien conocidos en el arte, y ensayos con ácido nucleico peptídico (PNA) (Orum et al., *Nucl. Acids Res.* 21: 5332 - 5356 (1993); Thiede et al., *Nucl. Acids Res.* 24: 983 - 984 (1996)). Una guía adicional es proporcionada por Sambrook J et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 2000).

Los niveles de ARNm o de proteína del TNF- α pueden ser determinados por medio de métodos conocidos por aquellos capacitados en el arte. Ver, las patentes de los Estados Unidos Nos. 6.566.501; 6.541.620; y 6.537.540. Una discusión de los niveles del nivel del factor de necrosis tumoral en trastornos asociados con el TNF es suministrada en la Patente de los Estados Unidos No. 6.537.540.

Como se lo utiliza aquí, se determina que el nivel de ARNm del TNF- α (SEQ ID NO: 7) en la muestra es "alto" cuando la relación de ARNm del TNF- α con respecto a la expresión de actina β (SEQ ID NO: 9; ver, Actor J. K. et al.,

Comb Chem High Throughput Screen 3(4): 343 - 51 (Agosto de 2000)) o la expresión de GAPDH (ver, Anderson GD et al., J Clin Invest. 97(11): 2672 - 9 (Junio 1, 1996)) en la muestra es aproximadamente el doble de alta o más alta que la relación del ARNm del TNF- α con respecto a la expresión de β actina, comparado con una muestra de un individuo (o preferiblemente una población de individuos) que no tienen una condición inflamatoria de la piel. Como se lo utiliza aquí, se determina que el nivel de ARNm del TNF- α en la muestra es "bajo o normal" cuando la relación de ARNm del TNF- α con relación a la expresión de actina β en la muestra es aproximadamente igual a o menor a la relación de ARNm del TNF- α con relación a la expresión de actina β , comparado con una muestra de un individuo (o preferiblemente, una población de individuos) que no tiene una condición inflamatoria de la piel. Para obtener una orientación en cuanto a qué niveles de ARNm y de proteína del TNF- α en el tejido se espera generalmente que sean "bajos", "normales" o "altos", ver, Van Deventer SJH, Gut 40: 443 - 8 (1997); McAlindon M. E. & Mahida Y. R., Aliment Pharmacol Ther 10 (suppl 2): 72 - 4 (1996); Reimund J-M et al., J Clin Immunol 16: 144 - 50 (1996); Reinecker H-C et al., Clin Exp Immunol 94: 174 - 81 (1993); Murch S. H. et al., Gut. 34: 1705 - 9 (1993) y Grom A. A. et al., Arthritis Rheum 39: 1703 - 1710 (1996). Alternativamente, alguien capacitado en el arte puede definir un nivel promedio o esperado de expresión de ARNm del TNF- α en una población, por ejemplo, llevando a cabo el ensayo en diez o más individuos de control (por ejemplo por medio de los métodos mostrados en el EJEMPLO) y obteniendo la desviación estándar y promedio.

Las muestras para la determinación de polimorfismos genéticos, niveles de ARNm del *TNF* (SEQ ID NO: 7) o niveles de proteína del TNF (SEQ ID NO: 8) puede ser recolectadas de individuos por medio de cualquier método apropiado conocido por aquellos capacitados en el campo médico. Las muestras pueden ser muestras de fluidos, tales como sangre, mucosidades, fluido linfático, fluido sinovial, fluido cerebroespinal, saliva, fluido amniótico, sangre del cordón umbilical amniótico, orina, fluido vaginal y semen u otros fluidos corporales. Alternativamente, las muestras pueden ser muestras de tejido, tales como muestras de biopsias, homogenizados, lisados o extractos preparados a partir de un organismo completo o un subgrupo de sus tejidos, células o partes componentes, o una fracción o porción de los mismos. Una muestra puede ser también un medio, por ejemplo un caldo nutriente o gel en el cual un organismo ha sido propagado, que contiene componentes celulares, tales como moléculas de proteína o de ácido nucleico.

La guía para el uso de pimecrolimus en crema al 1 % es suministrada por Novartis Pharmaceuticals Corp., Elidel® Prescribing Information, T2003-01, 89014902, 492573/1 US (Rev. Abril 2003). Una guía adicional para el uso de pimecrolimus es suministrada por Nghiem P et al., J Am Acad Dermatol 46: 228 - 241 (2002) y las referencias citadas allí y en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.912.238; 6.352.998 y 6.423.722.

La guía para el uso de tacrolimus en ungüento (0,03% ó 0,1%) es suministrada por Fujisawa Healthcare Inc., Protopic® Prescribing Information, 45670 (Diciembre 2000). La guía para el uso de Prograf® (cápsula oral o inyectable) es suministrada por Fujisawa Healthcare Inc., Prograf® Prescribing Information, ZL40306 y Fujisawa Healthcare Inc., Prograf® Product Monograph. Una guía adicional para el uso de tacrolimus es suministrada por Nghiem P et al., J Am Acad Dermatol 46: 228 - 241 (2002) y las referencias citadas allí.

Como se lo utiliza aquí, una "dosis alta de pimecrolimus" es una dosis sustancialmente más alta que la dosis recomendada de pimecrolimus. Por ejemplo, para adultos y niños mayores de dos años, se aplica una capa delgada de pimecrolimus en crema al 1% al área afectada dos veces al día, frotándola luego con suavidad. Una dosis sustancialmente mayor a la dosis recomendada puede ser la aplicación cuatro veces al día. Alternativamente, una dosis sustancialmente mayor a la recomendada puede ser la aplicación dos veces al día de una formulación de pimecrolimus con una concentración del 2% o superior, si se encuentra disponible. Igualmente, una "dosis alta de tacrolimus" es una dosis sustancialmente mayor a la dosis recomendada de tacrolimus.

El uso de otros inmunosupresores, tales como hidrocortisona, ciclosporina o sirolimus (rapamicina), en dermatología en forma general y en particular para dermatitis atópica, es bien conocida por aquellos capacitados en la práctica médica. Ver, Marsland A. M. & Griffiths C. E., Eur J Dermatol. 2(6): 618 - 22 (Noviembre - Diciembre 2002) y Nghiem P et al., J Am Acad Dermatol 46: 228 - 241 (2002).

El diagnóstico de la dermatitis atópica es bien conocido por aquellos capacitados en la práctica médica. Ver, Cookson WO et al., Nature Genetics 27: 372 - 373 (2001); Nghiem P et al., J Am Acad Dermatol 46: 228 - 241 (2002) y las referencias citadas allí.

Polimorfismos de nucleótidos individuales. La variación en la secuencia en el genoma humano consiste en principalmente de polimorfismos de nucleótidos individuales ("SNP") siendo el resto de las variaciones de la secuencia cortas repeticiones en tándem (incluidos microsatélites), largas repeticiones en tándem (minisatélite) y otras inserciones y supresiones. Un SNP es una posición en la cual se presentan dos bases alternativas con apreciable frecuencia (es decir >1%) en la población humana. Se dice que un SNP es "alélico" ya que debido a la existencia del polimorfismo, algunos miembros de una especie pueden tener la secuencia no mutada (es decir, el "alelo" original) mientras que otros miembros pueden tener una secuencia mutada (es decir, el alelo variante o mutante). En el caso más sencillo, puede existir únicamente una secuencia mutada, y se dice que el polimorfismo es dialélico. La ocurrencia de mutaciones alternativas puede dar lugar a polimorfismos trialélicos, etc. Los SNP se han

generalizado en todo el genoma y los SNP que alteran la función de un gen pueden ser contribuyentes directos a una variación fenotípica. Debido a su prevalencia y naturaleza generalizada, los SNP tienen potencial para ser herramientas importantes para la localización de genes que estén involucrados en estados de enfermedad en humanos, ver por ejemplo, Wang et al., Science 280: 1077 - 1082 (1998), que divulga un estudio piloto en el cual se mapearon 2.227 sobre un región de 2,3 megabases de ADN.

Una asociación entre polimorfismos de nucleótidos individuales y un fenotipo particular no indica o requiere que el SNP sea causal del fenotipo. En vez de eso, tal asociación puede indicar únicamente que el SNP está localizado cerca del sitio sobre el genoma donde existen los factores determinantes para el fenotipo y por lo tanto es más probable que se encuentre en asociación con estos factores determinantes y por lo tanto con el fenotipo de interés. De este modo, un SNP puede estar en desequilibrio de enlazamiento (LD) con la variante funcional 'verdadera'. LD, también conocida como asociación alélica, existe cuando alelos en dos diferentes ubicaciones del genoma están más altamente relacionados de lo esperado.

Por lo tanto un SNP puede servir como marcador que tenga valor en virtud de su proximidad a una mutación que provoca un fenotipo particular.

Los SNP que están asociados con enfermedad pueden tener también un efecto directo sobre la función del gen en el cual están localizados. Una variante de una secuencia puede resultar en un cambio de un aminoácido o puede alterar el empalme exón-intrón, modificando por lo tanto directamente la proteína relevante, o puede existir en una región reguladora, alterando el ciclo de expresión o la estabilidad del ARNm, ver Nowotny P Current Opinions in Neurobiology 11: 637 - 641 (2001).

Cada vez es más claro que el riesgo de desarrollar muchos trastornos comunes y el metabolismo de los medicamentos utilizados para tratar estas condiciones están sustancialmente influenciados por variaciones genómicas subyacentes, aunque los efectos de cualquier variante podrían ser pequeños.

Por lo tanto, una asociación entre un SNP y un fenotipo clínico sugiere, (1) que el SNP es funcionalmente responsable por el fenotipo o, (2) existen otras mutaciones cerca de la ubicación del SNP sobre el genoma que provoca el fenotipo. La segunda posibilidad se basa en la biología de la herencia. Grandes pedazos de ADN se heredan y los marcadores próximos entre sí pueden no haberse recombinado en los individuos que no están relacionados por muchas generaciones, es decir, los marcadores están en desequilibrio de enlazamiento (LD).

Identificación y caracterización de los SNP. Se pueden utilizar muchas técnicas diferentes para identificar y caracterizar los SNP, incluyendo un análisis de polimorfismo de conformación monocatenaria, análisis heterodúplex por medio de cromatografía líquida desnaturante de alto rendimiento (DHPLC), secuenciación directa de ADN y métodos computacionales, ver Shi MM, Clin Chem 47: 164 - 172 (2001). Gracias a la gran cantidad de información de secuencias en las bases de datos públicas, se pueden utilizar herramientas computacionales para identificar los SNP *in silico* por medio de la alineación de secuencias presentadas en forma independiente para un gen dado (ya sean secuencias de ADNc o genómicas). La comparación de los SNP obtenidos experimentalmente y por medio de métodos *in silico* mostraron que 55% de los SNP candidatos encontrados por SNPfinder (<http://lpgws.nci.nih.gov:82/perl/snp/snp.cgi.pl>) también han sido descubiertos experimentalmente, ver, Cox et al. Hum Mutat 17: 141 - 150 (2001). Sin embargo, estos métodos *in silico* sólo pueden encontrar 27% de los SNP verdaderos.

Los métodos más comunes de tipificación del SNP actualmente incluyen métodos de hibridación, extensión del iniciador y escisión. Cada uno de estos métodos debe ser conectado a un sistema de detección apropiado. Las tecnologías de detección incluyen polarización fluorescente, (ver Chan X et al. Genome Res 9: 492 - 499 (1999)), detección luminométrica de liberación de pirofosfato (pirosecuenciación), (ver Ahmadian A et al., Anal Biochem 280: 103 - 110 (2000)), ensayos de escisión con base en la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET, DHPLC, y espectrometría de masas, (ver Shi MM, Clin Chem 47: 164 - 172 (2001) y la Patente de los Estados Unidos No. 6.300.076 B1). Otros métodos de detección y caracterización de los SNP son aquellos divulgados en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6.297.018 B1 y 6.300.063 B1.

En una modalidad particularmente preferida, se pueden lograr la detección del polimorfismo por medio de la así llamada tecnología INVADER™ (que puede ser adquirida a Third Wave Technologies Inc. Madison, Wis.). En este ensayo, un oligonucleótido "invasor" específico secuencia arriba y una sonda secuencia abajo que se superpone parcialmente forman juntos una estructura específica cuando se enlazan a una plantilla de ADN complementario. Esta estructura es reconocida y cortada en un sitio específico por medio de la enzima Cleavase, y esto da como resultado la liberación del alerón 5' del oligonucleótido de la sonda. Este fragmento sirve luego como el oligonucleótido "invasor" con respecto a objetivos secundarios sintéticos y sondas secundarias de señal marcadas en forma fluorescente contenidas en la mezcla de reacción. Esto da como resultado una escisión específica de las sondas secundarias de señal por parte de la enzima Cleavase. Se genera la señal de fluorescencia cuando esta sonda secundaria, marcada con moléculas colorantes capaces de transferir energía de resonancia de fluorescencia,

es escindida. Las Cleavases tienen requerimientos restrictivos con relación a la estructura formada por las secuencias o alerones de ADN que se superponen y pueden, por lo tanto, ser utilizadas para detectar específicamente fallas individuales en el apareamiento de bases secuencia arriba del sitio de escisión sobre la cadena de ADN secuencia abajo. Ver Ryan D et al. Molecular Diagnosis 4 (2): 135 - 144 (1999) y Lyamichev V et al. Nature Biotechnology 17: 292 - 296 (1999), ver también las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.846.717 y 6.001.567.

En algunas modalidades, una composición contiene dos o más oligonucleótidos de genotipificación marcados en forma diferente para sondear en forma simultánea la identidad de los nucleótidos en dos o más sitios polimórficos. También se contempla que las composiciones de los iniciadores puedan contener dos o más grupos de pares de iniciadores específicos del alelo para permitir el direccionamiento y amplificación simultáneos de dos o más regiones que contienen un sitio polimórfico.

Los oligonucleótidos de genotipificación pueden ser también inmovilizados o sintetizados sobre una superficie sólida tal como un microchip, esfera, o portaobjetos de vidrio (ver, por ejemplo, WO 98/20020 y WO 98/20019). Tales oligonucleótidos de genotipificación inmovilizados pueden ser utilizados en una variedad de ensayos para la detección del polimorfismo, incluyendo pero sin limitarse a ensayos de hibridación de sondas y extensión de la polimerasa. Los oligonucleótidos de genotipificación inmovilizados pueden incluir un arreglo ordenado de oligonucleótidos diseñados para seleccionar rápidamente una muestra de ADN por los polimorfismos en múltiples genes al mismo tiempo.

Un iniciador oligonucleótidos específico del alelo tiene un nucleótido en el terminal 3', o preferiblemente un penúltimo nucleótido 3', que es complementario no solamente con un nucleótido de un SNP particular, actuando por lo tanto como un iniciador para extensión mediada por polimerasa únicamente si el alelo que contiene ese nucleótido está presente. Los iniciadores oligonucleótidos específicos del alelo que hibridan ya sea a la hebra de codificación o a la hebra que no codifica están contemplados. Se puede desarrollar un iniciador ASO para detectar polimorfismos del gen utilizando técnicas conocidas por aquellos capacitados en el arte.

Otros oligonucleótidos de genotipificación hibridan a una región objetivo localizada entre uno y varios nucleótidos secuencia abajo de uno de los nuevos sitios polimórficos identificados aquí. Tales oligonucleótidos son útiles en métodos de extensión del iniciador mediados por polimerasa para detectar uno de los nuevos polimorfismos descritos aquí y por lo tanto tales oligonucleótidos de genotipificación son llamados aquí como "oligonucleótidos para extensión del iniciador". En una modalidad preferida, el terminal 3' del oligonucleótidos para extensión del iniciador es un desoxinucleótido complementario al nucleótido localizado en forma inmediatamente adyacente al sitio polimórfico.

En otra modalidad, la divulgación provee un kit que contiene al menos dos oligonucleótidos de genotipificación empacados en recipientes separados. El kit puede contener también otros componentes tales como amortiguador de hibridación (donde los oligonucleótidos son utilizados como sonda) empacado en un recipiente separado. Alternativamente, donde se utilizan dos oligonucleótidos para amplificar una región objetivo, el kit puede contener, empacado en recipientes separados, una polimerasa y un amortiguador de redacción optimizado para extensión del iniciador mediada por la polimerasa, tal como PCR.

Las composiciones de oligonucleótidos y los kits anteriormente descritos son útiles en métodos para genotipificación y/o haplotipificación del gen en un individuo. Como se utiliza aquí, los términos "genotipo" y "haplotipo" significan el genotipo o haplotipo que contienen el par de nucleótidos o el nucleótido, respectivamente, que está presente en uno o más de los nuevos sitios polimórficos descritos aquí y pueden opcionalmente incluir también al par de nucleótidos o al nucleótido presente en uno o más sitios polimórficos adicionales en el gen. Los sitios polimórficos adicionales pueden ser sitios polimórficos actualmente conocidos o sitios que sean posteriormente descubiertos.

Una modalidad del método de genotipificación involucrar el aislamiento del individuo de una mezcla de ácido nucleico que contiene las dos copias del gen, o un fragmento del mismo, que están presentes en el individuo, y determinan la identidad del par de nucleótidos en uno o más de los sitios polimórficos en las dos copias para asignar un genotipo al individuo. Como lo comprenderá fácilmente alguien capacitado en el arte, las dos "copias" de un gen en un individuo pueden ser el mismo alelo o pueden ser alelos diferentes. En una modalidad particularmente preferida, el método de genotipificación comprende la determinación de la identidad del par de nucleótidos en cada sitio polimórfico.

Típicamente, se aísla la mezcla de ácido nucleico de una muestra biológica tomada del individuo, tal como una muestra de sangre o una muestra de tejido. Las muestras adecuadas de tejido incluyen sangre entera, semen, saliva, lágrimas, orina, materia fecal, sudor, frotis vocal, piel y cabello. La mezcla de ácido nucleico puede contener ADN genómico, ARNm, o ADNc y, en los últimos dos casos, la muestra biológica debe ser obtenida de un órgano en el cual se exprese el gen. Además, alguien capacitado en el arte comprenderá que las preparaciones de ARNm o

ADNc no serían utilizadas para detectar polimorfismos localizados en intrones o en regiones no transcritas 5' y 3'. Si se aísla un fragmento de gen, debe contener el(los) sitio(s) polimórfico(s) que son genotipificados.

Una modalidad del método de haplotipificación comprende el aislamiento del individuo de una molécula de ácido nucleico que contiene únicamente una de las dos copias del gen, o un fragmento del mismo, que está presente en el individuo y determina en esa copia la identidad del nucleótido en uno o más de los sitios polimórficos en esa copia para asignar un haplotipo al individuo. Se puede aislar el ácido nucleico utilizando cualquier método capaz de separar las dos copias del gen o del fragmento, incluyendo pero sin limitarse a, uno de los métodos descritos anteriormente para la preparación de isogenes, siendo el enfoque preferido la clonación dirigida *in vivo*. Como se darán cuenta fácilmente aquellos capacitados en el arte, cualquier clon individual únicamente suministrará información del haplotipo sobre una de las dos copias del gen presentes en un individuo. Si se desea la información del haplotipo para la otra copia del individuo, se requerirá examinar clones adicionales. Típicamente, se deben examinar al menos cinco clones para tener más de un 90% de probabilidad de haplotipificación de ambas copias del gen en un individuo. En una modalidad particularmente preferida, se identifica el nucleótido en cada sitio polimórfico.

En una modalidad preferida, se determina un par haplotipo para un individuo por medio de la identificación de la secuencia de nucleótidos en fase en uno o más de los sitios polimórficos en cada copia del gen que está presente en el individuo. En una modalidad particularmente preferida, el método de haplotipificación comprende la identificación de la secuencia de nucleótidos en fase en cada sitio polimórfico en cada copia del gen. Cuando se haplotipifican ambas copias del gen, se lleva a cabo preferiblemente la etapa de identificación con cada copia del gen que es colocada en recipientes separados. Sin embargo, también se prevé que si se marcan las dos copias con etiquetas diferentes, o bien son distinguibles o identificables en forma separada, sería posible en algunos casos realizar el método en el mismo recipiente. Por ejemplo, si se marcan una primera y una segunda copia del gen con un primero y un segundo colorantes fluorescentes diferentes, respectivamente, y se utiliza un oligonucleótido específico del alelo marcado incluso con un tercer colorante fluorescente diferente para analizar el(los) sitio(s) polimórfico(s), detectando luego una combinación del primer y el tercer colorantes se identificaría el polimorfismo en la primera copia del gen mientras que la detección de una combinación del segundo y el tercer colorantes identificaría al polimorfismo en la segunda copia del gen.

Tanto en el método de genotipificación como en el de haplotipificación, se puede determinar la identidad de un nucleótido (o de un par de nucleótidos) en un sitio(s) polimórfico(s) por medio de la aplicación de una región(es) objetivo que contiene(n) el(los) sitio(s) polimórfico(s) directamente de una o ambas copias del gen, o fragmento del mismo, y la secuencia de la(s) región(es) amplificada(s) determinada(s) por medio de métodos convencionales. Se apreciará fácilmente por parte de una persona capacitada en el arte que se detectará únicamente un nucleótido en un sitio polimórfico en individuos que son homocigotos en ese sitio, mientras que se detectarán dos nucleótidos diferentes si el individuo es heterocigotos para ese sitio. Se puede identificar directamente el polimorfismo, conocida como identificación de tipo positivo, o por inferencia, denominada como identificación de tipo negativo. Por ejemplo, dónde se sabe que un SNP es guanina y citosina en una población de referencia, se puede determinar positivamente que un sitio es o bien guanina o citosina para todos los individuos homocigotos en ese sentido, o tanto guanina como citosina, si el individuo es heterocigoto en ese sitio. Alternativamente, se puede determinar negativamente que el sitio no es guanina (y por lo tanto citosina/citosina) o no citosina (y por lo tanto guanina/guanina).

Además, la identidad del(de los) alelo(s) presente(s) en cualquiera de los nuevos sitios polimórficos descritos aquí puede ser determinada indirectamente por medio de genotipificación de un sitio polimórfico no divulgado aquí que esté en desequilibrio de enlazamiento con el sitio polimórfico que sea de interés. Se dice que dos sitios están en desequilibrio de enlazamiento si la presencia de una variante particular en un sitio mejora la previsibilidad de otra variante en el segundo sitio (ver, Stevens J. C., *Mol Diag* 4: 309 - 317 (1999)). Los sitios polimórficos en desequilibrio de enlazamiento con los sitios polimórficos actualmente divulgados pueden ser localizados en regiones del gen o en otras regiones genómicas no examinadas aquí. La genotipificación de un sitio polimórfico en desequilibrio de enlazamiento con los nuevos sitios polimórficos descritos aquí puede ser realizada, pero sin limitarse a, por medio de cualquiera de los métodos anteriormente mencionados para detectar la identidad del alelo en un sitio polimórfico.

La(s) región(es) objetivo puede(n) ser amplificada(s) utilizando cualquier método de amplificación dirigido al oligonucleótidos, incluyendo pero sin limitarse a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Patente de los Estados Unidos No. 4.965.188), reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Barany et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 189 - 193 (1991); solicitud de patente PCT WO 90/01069), y ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA) (Landegren et al., *Science* 241: 1077 - 1080 (1988)). Los oligonucleótidos útiles como iniciadores o como sondas en tales métodos deben hibridar específicamente a una región del ácido nucleico que contiene o es adyacente al sitio polimórfico. Típicamente, los oligonucleótidos están entre 10 y 35 nucleótidos de longitud y preferiblemente, entre 15 y 30 nucleótidos de longitud. Más preferiblemente, los oligonucleótidos son de 20 a 25 nucleótidos de longitud. La longitud exacta del oligonucleótido dependerá de muchos factores que son rutinariamente considerados y practicados por la persona entrenada en la materia.

Otros procedimientos conocidos de amplificación de ácido nucleico pueden ser utilizados para amplificar la región objetivo incluidos los sistemas de amplificación basados en la transcripción (Patente de los Estados Unidos No. 5.130.238; EP 329.822; Patente de los Estados Unidos No. 5.169.766, WO 89/06700) y métodos isotérmicos (Walker et al., Proc Natl Acad Sci USA 89: 392 - 396 (1992)).

5 También se puede analizar un polimorfismo en la región objetivo antes o después de la amplificación utilizando uno de los diferentes métodos basados en hibridación conocidos en el arte. Típicamente, se utilizan oligonucleótidos específicos del alelo para la realización de tales métodos. Se pueden utilizar los oligonucleótidos específicos del alelo como pares de sondas marcadas de diferente manera, con un miembro del par mostrando una correspondencia perfecta con una variante de una secuencia objetivo y mostrando el otro miembro una perfecta correspondencia con una variante diferente. En algunas modalidades, se puede detectar más de un sitio polimórfico árabes utilizando un grupo de oligonucleótidos específicos del alelo o pares de oligonucleótidos. Preferiblemente, los miembros del grupo tienen temperaturas de fusión dentro de 5°C y más preferiblemente dentro de 2°C, de cada uno de los otros cuando se hibrida a cada uno de los sitios polimórficos que está siendo detectado.

15 La hibridación de un oligonucleótido específico del alelo a un polinucleótido objetivo puede ser realizada con ambas entidades en solución o tal hibridación puede ser realizada cuando ya sea cuando el oligonucleótido o el polinucleótido objetivo se una n forma covalente o no covalente a un soporte sólido. La unión puede ser mediada, por ejemplo, por medio de interacciones antígeno-anticuerpo, poli-L-Lys, estreptavidina o avidina-biotina, puentes salinos, interacciones hidrófobas, enlaces químicos, cocción de entrelazamiento con UV, etc. Se pueden sintetizar oligonucleótidos específicos del alelo directamente sobre el soporte sólido o unirlos al soporte sólido posteriormente a la síntesis. Los soportes sólidos adecuados para uso en los métodos de detección incluyen sustratos elaborados de silicio, vidrio, plástico, papel y similares, que pueden ser formados, por ejemplo, en pozos (como en placas de 96 pozos), portaobjetos, láminas, membranas, fibras, chips, placas, y esferas. El soporte sólido puede ser tratado, recubierto o convertido en derivado para facilitar la inmovilización del oligonucleótido específico del alelo o ácido nucleico objetivo.

25 El genotipo o haplotipo para el gen de un individuo puede ser determinado también por medio de hibridación de una muestra de nucleica que contiene una o ambas copias del gen a arreglos y subarreglos de ácido nucleico tal como se describe en WO95/11995. Los arreglos contendrían una batería de oligonucleótidos específicos del alelo que representan cada uno de los sitios polimórficos que se incluirían en el genotipo o haplotipo.

30 También se puede determinar la identidad de polimorfismos utilizando una técnica de detección de fallos en el apareamiento, incluyendo pero sin limitarse al método de protección con ARNasa usando ribosondas (Winter et al., Proc Natl Acad Sci USA 82: 7575 (1985); Meyers et al., Science 230: 1242 (1985)) y proteínas que reconocen fallas de apareamiento de nucleótidos, tales como la proteína mutS de *E. coli* (Modrich P. Ann Rev Genet 25: 229 - 253 (1991)). Alternativamente, se pueden identificar variantes de alelos por medio de análisis del polimorfismo de conformación monocatenaria (SSCP) (Orita et al., Genomics 5: 874 - 879 (1989); Humphries et al., en Molecular Diagnosis of Genetic Diseases, R. Elles, ed., páginas 321 - 340 (1996)) o electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) (Wartell et al., Nucl Acids Res 18: 2699 - 2706 (1990); Sheffield et al., Proc Natl Acad Sci USA 86: 232 - 236 (1989)).

40 Se puede utilizar también un método de extensión del iniciador mediado por polimerasa para identificar el(los) polimorfismo(s). Se han descrito varios de tales métodos en la patente y en literatura científica e incluyen el método "Análisis Genético de Bits" (WO 92/15712) y el análisis genético de bits mediado por ligasa / polimerasa (Patente de los Estados Unidos No. 5.679.524). Métodos relacionados son divulgados en WO91/02087, WO90/09455, WO95/17676, Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.302.509 y 5.945.283. Los iniciadores extendidos que contienen un polimorfismo pueden ser detectados por medio de espectrometría de masas como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5.605.798. Otro método de extensión del iniciador es PCR específica para el alelo (Ruafio et al., Nucl Acids Res 17: 8392 (1989); Ruafio et al., Nucl Acids Res 19: 6877 - 6882 (1991); WO93/22456; Turki et al., J Clin Invest 95: 1635 - 1641 (1995)). Además, se pueden investigar múltiples sitios polimórficos por medio de la amplificación simultánea de múltiples regiones del ácido nucleico utilizando grupos de iniciadores específicos para el alelo como se describe en WO 89/10414.

50 En una modalidad preferida, se examinan los datos de frecuencia del haplotipo para cada grupo etnogeográfico para determinar si es consistente con el equilibrio de Hardy-Weinberg. El equilibrio de Hardy-Weinberg (D. L. Hartl et al., Principles of Population Genomics, 3rd Ed. (Sinauer Associates, Sunderland, MA, 1997) postula que la frecuencia de hallar al par haplotipo H_1/H_2 es igual a $P_{H-W}(H_1/H_2) = 2p(H_1)p(H_2)$ si $H_1 \neq H_2$ y $P_{H-W}(H_1/H_2) = p(H_1)p(H_2)$ si $H_1 = H_2$. Una diferencia estadísticamente significativa entre las frecuencias observadas y esperadas del haplotipo podría ser debida a uno o más factores incluida endogamia significativa en el grupo poblacional, fuerte presión selectiva sobre el gen, desviación del muestreo, y/o errores en el proceso de genotipificación. Si se observan grandes desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg en un grupo etnogeográfico, se puede incrementar el número de individuos en ese grupo para observar si la desviación es debida a la desviación del muestreo. Si una muestra más grande no reduce la diferencia entre las frecuencias observada y esperada de pares de haplotipos, entonces uno podría considerar

haplotipificar al individuo utilizando un método director haplotipificación tal como, por ejemplo, la tecnología CLASPER System™ (Patente de los Estados Unidos No. 5.866.404), SMD, o PCR de amplio rango específica para el alelo (Michalotos-Beloin et al., Nucl Acids Res 24: 4841 - 4843 (1996)).

5 En una modalidad de este método para predecir un par haplotipo, la etapa de asignación implica llevar a cabo los siguientes análisis. Primero, se comparan cada uno de los posibles pares de haplotipos con los pares de haplotipos en la población de referencia. Generalmente, únicamente uno de los pares de haplotipos en la población de referencia coincide con un posible par de haplotipos y se asigna ese par al individuo. Ocasionalmente, únicamente un haplotipo representado en los pares de haplotipos de referencia es consistente con un posible par de haplotipos de un individuo, y en tales casos se le asigna al individuo un par de haplotipos que contiene este haplotipo conocido
10 y un nuevo haplotipo derivado restando el haplotipo conocido del posible par de haplotipos. En casos raros, o bien ninguno de los haplotipos en la población de referencia son consistentes con los posibles pares e haplotipos, o alternativamente, múltiples pares de haplotipos de referencia son consistentes con los posibles pares de haplotipos. En tales casos, preferiblemente se haplotipifica al individuo utilizando un método directo de haplotipificación molecular tal como, por ejemplo, tecnología CLASPER System™ (Patente de los Estados Unidos No. 5.866.404),
15 SMD, o PCR de amplio rango específico para el alelo (Michalotos-Beloin et al., Nucl Acids Res 24: 4841 - 4843 (1996)).

La divulgación también provee un método para determinar la frecuencia de un genotipo o haplotipo en una población. El método comprende determinar el par del genotipo o el par del haplotipo para el gen que está presente en cada miembro de la población, en donde el genotipo o el haplotipo incluye en el par de nucleótidos o el nucleótido
20 detectados en uno o más de los sitios polimórficos en el gen, y calcular la frecuencia y el genotipo o el haplotipo de cualquier genotipo o haplotipo particular en que se encuentra en la población. La población puede ser una población de referencia, una población familiar, una misma población sexual, un grupo de población, una población de rasgos (por ejemplo, un grupo de individuos que exhiben un rasgo de interés tal como una condición médica o respuesta a un tratamiento terapéutico).

25 En otro aspecto de la divulgación, los datos de frecuencia para genotipos y/o haplotipos encontrados en una población de referencia son utilizados en un método para identificar una asociación entre un rasgo y un genotipo o un haplotipo. El rasgo puede ser cualquier fenotipo detectable, incluyendo pero sin limitarse a susceptibilidad a una enfermedad o respuesta a un tratamiento. El método involucra obtener datos sobre la frecuencia del genotipo(s) o haplotipo(s) de interés en una población de referencia así como en una población que exhiben el rasgo. Los datos
30 de frecuencia para una o ambas de las poblaciones de rasgos y de referencia pueden ser obtenidos por medio de genotipificación o haplotipificación de cada individuo en las poblaciones utilizando uno de los métodos descritos anteriormente. Los haplotipos para la población de rasgos se pueden determinar directamente o, alternativamente, por medio del genotipo predictivo para el enfoque del haplotipo descrito anteriormente.

35 En otra modalidad, los datos de frecuencia para las poblaciones de referencia y/o de rasgos se obtienen accediendo previamente a los datos de frecuencia determinados, que pueden estar en forma escrita o electrónica. Por ejemplo, los datos de frecuencia pueden estar presentes en una base de datos que sea accesible a través de un ordenador. Una vez se obtienen los datos de frecuencia, se comparan las frecuencias del(de los) genotipo(s) o haplotipo(s) de interés en las poblaciones de referencia y de rasgos. En una modalidad preferida, se comparan las frecuencias de todos los genotipos y/o haplotipos observados en las poblaciones. Si un genotipo o haplotipo particular para el gen
40 es más frecuente en la población de rasgos que en la población de referencia en una cantidad estadísticamente significativa, entonces se predice que el rasgo está asociado con aquel genotipo o haplotipo.

En una modalidad preferida se lleva a cabo un análisis estadístico por medio del uso de ensayos ANOVA estándar con un método de corrección de Bonferoni y/o autoelevación que simula la correlación genotipo fenotipo muchas veces y calcula un valor con significado. Cuando se analizan muchos polimorfismos, se puede llevar a cabo una
45 corrección de los factores para corregir una asociación significativa que pueda encontrarse por casualidad. Para métodos estadísticos ver: Statistical Methods in Biology, 3rd edition, Bailey NTJ, (Cambridge Univ. Press, 1997); Introduction to Computational Biology, Waterman MS (CRC Press, 2000) y Bioinformatics, Baxevanis AD & Ouellette BFF editors (John Wiley & Sons, Inc., 2001).

50 En una modalidad preferida del método, el rasgo de interés es una respuesta clínica exhibida por un paciente a algún tratamiento terapéutico, por ejemplo, la respuesta a un fármaco específico o la respuesta a un tratamiento terapéutico para una condición médica.

En otra modalidad, se puede utilizar un genotipo o haplotipo detectable que esté en desequilibrio de enlazamiento con el genotipo o haplotipo de interés como un marcador sustituto. Un genotipo que está en desequilibrio de enlazamiento con un genotipo puede ser descubierto determinando si un genotipo o haplotipo particular para el gen
55 es más frecuente en la población que también demuestra el genotipo del marcador sustituto potencial que en la población de referencia en una cantidad estadísticamente significativa, entonces se predice que el genotipo del

marcador está asociado con aquel genotipo o haplotipo y por lo tanto puede ser utilizado como un marcador sustituto en lugar del genotipo.

Definiciones. Como se utiliza aquí, "condición médica" incluye pero no se limita a cualquier condición o enfermedad que se manifiesta como uno o más síntomas físicos y/o psicológicos para los cuales es deseable el tratamiento, que incluye enfermedades y otros trastornos nuevos y previamente identificados.

Como se lo utiliza aquí, el término " respuesta clínica" significa uno cualquiera o todos de los siguientes: una medición cuantitativa de la respuesta, sin respuesta, y respuesta adversa (es decir, efectos secundarios).

Con el propósito de deducir una correlación entre una respuesta clínica a un tratamiento y un genotipo o haplotipo, se obtienen datos sobre las respuestas clínicas exhibidas por una población de individuos que recibió el tratamiento, en adelante la "población clínica". Éstos datos clínicos pueden ser obtenidos analizando los resultados de un ensayo clínico que haya sido realizado y/o se pueden obtener los datos clínicos diseñando y llevando a cabo uno o más ensayos clínicos nuevos.

Como se lo utiliza aquí, el término " ensayo clínico" significa cualquier estudio investigativo diseñado para recolectar datos clínicos sobre respuestas a un tratamiento particular, e incluye pero no se limita a ensayos clínicos en fase I, fase II y fase III. Se utilizan métodos estándar para definir la población de pacientes y para inscribir individuos.

Se prefiere que los individuos incluidos en la población clínica hayan sido clasificados por la existencia de la condición médica de interés. Esta clasificación de pacientes potenciales podría emplear un examen físico estándar o uno o más análisis de laboratorio. Alternativamente, la clasificación de los pacientes podría utilizar haplotipificación para situaciones donde exista una fuerte correlación entre un par de haplotipos y susceptibilidad o severidad de la enfermedad.

El tratamiento terapéutico de interés se administra cada individuo en la población para el ensayo y cada respuesta del individuo al tratamiento se mide utilizando uno o más criterios predeterminados. Se contempla que en muchos casos, la población para el ensayo exhibirá un rango de respuestas y que el investigador escogerá el número de grupos de respuesta (por ejemplo, bajo, medio, alto) compuesto por las diferentes respuestas. Además, se genotipifica y/o haplotipifica el gen para cada individuo en la población para el ensayo, que puede hacerse antes o después de administrar el tratamiento.

Después de obtener tanto los datos clínicos como de polimorfismo, se crean correlaciones entre la respuesta de los individuos y el contenido de genotipo o de haplotipo. Las correlaciones pueden ser producidas en diferentes formas. En un método, se agrupan los individuos por su genotipo o haplotipo (o par de haplotipos) (también denominado como grupo de polimorfismo), y luego se calculan las desviaciones estándar y promedio de respuestas clínicas exhibidas por los miembros de cada grupo de polimorfismo.

Se analizan luego estos resultados para determinar si cualquier variación observada en la respuesta clínica entre grupos de polimorfismo es estadísticamente significativa. Los métodos de análisis estadístico que pueden ser utilizados están escritos en L. D. Fisher & G. vanBelle, *Biostatistics: A Methodology for the Health Sciences* (Wiley-Interscience, New York, 1993). Este análisis puede incluir también un cálculo de regresión de cuáles sitios polimórficos en el gen producen la contribución más significativa a las diferencias en fenotipo.

Un segundo método para hallar correlaciones entre el contenido de haplotipo y las respuestas clínicas utiliza modelos preventivos con base en algoritmos de optimización que minimizan los errores. Uno de los muchos algoritmos posibles de optimización es un algoritmo genético (R. Judson, "Genetic Algorithms and Their Uses in Chemistry" en *Reviews in Computational Chemistry*, Vol. 10, páginas 1 - 73, K. B. Lipkowitz & D. B. Boyd, eds. (VCH Publishers, New York, 1997). También se pueden utilizar hibridación simulada (Press et al., "Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing", Cambridge University Press (Cambridge) 1992, Ch. 10), redes neuronales (E. Rich y K. Knight, "Artificial Intelligence", 2nd Edition (McGraw-Hill, New York, 1991, Ch. 18), métodos estándar de descenso del gradiente (Press et al., *supra* Ch. 10), u otros enfoques de optimización global o local (ver la discusión en Judson, más arriba).

También se pueden analizar las correlaciones utilizando técnicas de análisis de variación (ANOVA) para determinar cuánto de la variación en los datos clínicos es explicada por diferentes subgrupos de los sitios polimórficos en el gen. ANOVA se utiliza para analizar hipótesis acerca de si una respuesta variable es causada por o está correlacionada con uno o más rasgos o variables que pueden ser medidos (Fisher & vanBelle, ver más arriba, Ch. 10).

A partir de los análisis descritos más arriba, se puede construir fácilmente un modelo matemático por parte de una persona capacitada en el arte que prediga la respuesta clínica en función del contenido de genotipo o de haplotipo.

5 La identificación de una asociación entre una respuesta clínica y un genotipo o haplotipo (o par de haplotipos) para el gen puede ser la base para diseñar un método de diagnóstico para determinar aquellos individuos que responderán o no al tratamiento, o alternativamente, responderán a un nivel menor y por lo tanto pueden requerir de más tratamiento, es decir, una mayor dosis de un fármaco. El método de diagnóstico puede tomar una de las siguientes formas: por ejemplo, un ensayo directo de ADN (es decir, genotipificación o haplotipificación de uno o más de los sitios polimórficos en el gen), un ensayo serológico, o una medida del examen físico. El único requerimiento es que exista una buena correlación entre los resultados del ensayo de diagnóstico y el genotipo o el haplotipo subyacente que a su vez está correlacionado con la respuesta clínica. En una modalidad preferida, este método diagnóstico utiliza el método predictivo de haplotipificación descrito más arriba.

10 Un ordenador puede implementar una o todas las operaciones analíticas y matemáticas involucradas en la realización de los métodos de la presente divulgación. Además, el ordenador puede ejecutar un programa que genere vistas (o pantallazos) desplegadas sobre un dispositivo de visualización y con las cuales puede interactuar el usuario para observar y analizar grandes cantidades de información relacionadas con el gen y su variación genómica, incluida la localización en el cromosoma, estructura del gen, y la familia del gen, datos de expresión
15 génica, datos de polimorfismo, datos de la secuencia genética, y datos de la población de datos clínicos (por ejemplo, datos sobre el origen etnogeográfico, respuestas clínicas, genotipos, y haplotipos para una o más poblaciones). Los datos de polimorfismo descritos aquí pueden ser almacenados como parte de una base de datos relacional (por ejemplo, un caso de una base de datos Oracle o un conjunto de archivos planos ASCII). Estos datos de polimorfismo pueden ser almacenados en el disco duro del ordenador o pueden, por ejemplo, ser
20 almacenados en un CD-ROM o en uno o más dispositivos de almacenamiento accesibles por el ordenador. Por ejemplo, los datos pueden ser almacenados en una o más bases de datos en comunicación con el ordenador a través de una red. En otras modalidades, la divulgación provee métodos, composiciones, y kits para haplotipificación y/o genotipificación del gen en un individuo. Las composiciones contienen sondas e iniciadores oligonucleótidos diseñados para hibridar específicamente a una o más regiones objetivo que contienen, o que son adyacentes a, un sitio polimórfico. Los métodos y las composiciones para establecer el genotipo o el haplotipo de un individuo en los
25 nuevos sitios polimórficos descritos aquí son útiles para estudiar el efecto de los polimorfismos en la etiología de las enfermedades afectadas por la expresión y función de la proteína, estudiar la eficacia de fármacos objetivo, predecir la susceptibilidad del individuo a enfermedades afectadas por la expresión y función de la proteína y predecir la respuesta del individuo a fármacos que dirigen el producto génico.

30 En aún otra modalidad, la divulgación provee un método para identificar una asociación entre un genotipo o haplotipo y una característica. En modalidades preferidas, la característica es susceptibilidad a una enfermedad, la severidad de una enfermedad, la puesta en escena de una enfermedad o la respuesta a un fármaco. Tales métodos tienen aplicabilidad en el desarrollo de pruebas de diagnóstico y tratamientos terapéuticos para todas las aplicaciones farmacogenéticas donde exista el potencial para una asociación entre un genotipo y el resultado de un
35 tratamiento, incluidas las mediciones de eficacia, las mediciones de PK y las mediciones de los efectos secundarios.

La divulgación también provee un sistema de cómputo para almacenamiento y visualización de datos de polimorfismo determinados para el gen. El sistema de cómputo incluye una unidad de procesamiento; una pantalla; y una base de datos que contiene los datos de polimorfismo. Los datos de polimorfismo incluyen los polimorfismos, los genotipos y los haplotipos identificados para el gen en una población de referencia. En una modalidad preferida, el
40 sistema de cómputo es capaz de producir una visualización que muestre los haplotipos organizados de acuerdo con sus relaciones evolucionarias.

En otro aspecto, la divulgación provee sondas de SNP, que son útiles en la clasificación de las personas de acuerdo con sus tipos de variación genética. Las sondas de SNP son oligonucleótidos, que pueden discriminar entre alelos de un ácido nucleico de SNP en ensayos convencionales de discriminación alélica.

45 Como se lo utiliza aquí, un "ácido nucleico de SNP" es una secuencia de ácido nucleico, que contiene un nucleótido que es variable dentro de una secuencia de nucleótidos de otra manera idéntica entre individuos o grupos de individuos, existiendo por lo tanto como alelos. Tales ácidos nucleicos de SNP son preferiblemente de aproximadamente 15 hasta aproximadamente 500 nucleótidos de longitud. Los ácidos nucleicos de SNP pueden hacer parte de un cromosoma, o pueden ser una copia exacta de una parte de un cromosoma, por ejemplo, por
50 amplificación de dicha parte de un cromosoma a través de PCR o a través de clonación. Los ácidos nucleicos de SNP se denominan de ahora en adelante simplemente como "SNP". Las sondas de SNP son oligonucleótidos que son complementarios con un ácido nucleico de SNP.

Como se lo utiliza aquí, el término "complementario" significa exactamente complementario a lo largo del oligonucleótido en el sentido dado por Watson y Crick.

55 En ciertas modalidades preferidas, los oligonucleótidos son complementarios a un alelo del ácido nucleico de SNP, pero no a ningún otro alelo del ácido nucleico de SNP. Los oligonucleótidos de acuerdo con esta modalidad pueden discriminar entre alelos del ácido nucleico de SNP en diferentes formas. Por ejemplo, bajo condiciones restrictivas

- de hibridación, un oligonucleótido de longitud apropiada hibridará a un alelo del ácido nucleico de SNP, pero no a ningún otro alelo del ácido nucleico de SNP. El oligonucleótido puede ser marcado por medio de un marcador radioactivo o fluorescente. Alternativamente, se puede utilizar un oligonucleótido de longitud apropiada como iniciador para PCR, en donde el nucleótido del terminal 3' es complementario con un alelo del ácido nucleico de SNP, pero con ningún otro alelo. En esta modalidad, la presencia o la ausencia de amplificación por medio de PCR determina el haplotipo del ácido nucleico de SNP.
- Los fragmentos genómicos y de ADNc incluyen al menos un nuevo sitio polimórfico identificado aquí y tienen una longitud de al menos 10 nucleótidos y pueden extenderse hasta longitud completa del gen. Preferiblemente, un fragmento está entre 100 y 3000 nucleótidos de longitud, y más preferiblemente entre 200 y 2000 nucleótidos de longitud, y lo más preferible entre 500 y 1000 nucleótidos de longitud.
- En la descripción de los sitios polimórficos identificados aquí hace referencia a la hebra sentido del gen por conveniencia. Sin embargo, como lo reconoce alguien capacitado en el arte, las moléculas de ácido nucleico que contienen al gen pueden ser moléculas bicatenarias complementarias y por lo tanto la referencia a un sitio particular sobre la hebra sentido se refiere también al sitio correspondiente sobre la hebra antisentido complementaria. Por lo tanto, se puede hacer referencia al mismo sitio polimórfico sobre cualquier hebra y se puede diseñar un oligonucleótido para hibridar específicamente con cualquier hebra en la región objetivo que contiene al sitio polimórfico. Por lo tanto, la divulgación también incluye polinucleótidos monocatenarios que son complementarios con la hebra sentido de las variantes genómicas descritas aquí.
- En una modalidad preferida, tal kit puede incluir además un medio para recolectar muestras de ADN.
- En particular, la composición de iniciador de genotipificación puede incluir al menos dos grupos de pares de iniciadores específicos de alelo. Preferiblemente, se impactan los dos oligonucleótidos para genotipificación en recipientes separados.
- Debe entenderse que los métodos descritos aquí generalmente pueden incluir además el uso de un kit. Generalmente, los métodos pueden ser llevados a cabo *ex-vivo*, y tales métodos *ex-vivo* están específicamente contemplados. También, cuando los métodos pueden incluir etapas que pueden ser practicadas sobre el organismo humano o el de un animal, se contemplan específicamente los métodos que únicamente incluyen aquellas etapas que no son practicadas sobre el organismo humano o el de un animal.
- El(los) efecto(s) de los polimorfismo identificados aquí sobre la expresión pueden ser investigados preparando células y/o organismos recombinantes, preferiblemente animales recombinantes, que contengan una variante polimórfica del gen. Como se lo utiliza aquí, "expresión" incluye pero no se limita a uno o más de lo siguiente: transcripción del gen en ARNm precursor; empalme y otro procesamiento del ARNm precursor para producir ARNm maduro; estabilidad del ARNm; traducción del ARNm maduro en proteína (incluido el uso del codón y la disponibilidad del ARNt); y glicosilación y/o otras modificaciones del producto de la traducción, si se requieren para una adecuada expresión y función.
- Para preparar una célula recombinante, se puede introducir el isogén deseado en la célula en un vector de tal manera que el isogén permanezca extracromosómico. En tal situación, el gen será expresado por la célula desde la ubicación extracromosómica. En una modalidad preferida, se introduce el isogén en una célula de tal manera que se recomienda con el gen endógeno presente en la célula. Tal recombinación requiere que ocurra un doble evento de recombinación, dando por lo tanto como resultado el polimorfismo deseado del gen. Los vectores para la introducción de genes tanto para recombinación como para mantenimiento extracromosómico son conocidos en el arte, y se puede utilizar cualquier vector adecuado o constructo de vector. Métodos tales como electroporación, bombardeo de partículas, coprecipitación con fosfato de calcio y transducción viral para la introducción del ADN en las células, son conocidos en el arte; por lo tanto, la escogencia del método puede depender de la competencia y preferencia del experto en la materia.
- Los organismos recombinantes, es decir, animales transgénicos, que expresan una variante de un gen se preparan utilizando procedimientos estándar conocidos en el arte. Preferiblemente, se introduce una construcción que contenga la variante del gen en un animal no humano o un ancestro del animal en una fase embrionaria, es decir, el estadio de una sola célula, o en general aproximadamente no después del estadio de ocho células. Los animales transgénicos que portan las construcciones pueden elaborarse por diferentes métodos conocidos por aquellos capacitados en el arte. Un método involucra transfectar dentro del embrión un retrovirus construido para contener uno o más elementos aislantes, un gen o genes de interés, y otros componentes conocidos por aquellos capacitados en el arte para proveer un vector lanzadera completo que alberga al(los) gen(es) aislado(s) como un transgén, ver por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5.610.053. Otro método involucra inyectar directamente un transgén en el embrión. Un tercer método involucra el uso de células madre embrionarias.

Los ejemplos de animales, en los cuales se pueden introducir los isogenes incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, otros roedores, y primates no humanos (ver "The Introduction of Foreign Genes into Mice" y las referencias citadas allí, En: Recombinant DNA, Eds. J .D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski, & M. Zoller; W. H. Freeman and Company, New York, páginas 254 - 272). Se pueden utilizar animales transgénicos que expresan en forma estable un isogén humano y que producen proteína humana como modelos biológicos para estudiar enfermedades relacionadas con expresión y/o actividad anormal, y para seleccionar y ensayar diferentes fármacos, compuestos candidatos, y regímenes de tratamiento para reducir los síntomas o efectos de estas enfermedades.

En la práctica de la presente divulgación, se utilizan muchas técnicas convencionales en biología molecular, microbiología ADN recombinante. Estas técnicas son bien conocidas y están explicadas por ejemplo en "Current Protocols in Molecular Biology", Vols. I-III, Ausubel, Ed. (1997); Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989); "DNA Cloning: A Practical Approach", Vols. I and II, Glover, Ed. (1985); "Oligonucleotide Synthesis", Gait, Ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization", Hames & Higgins, Eds. (1985); "Transcription and Translation", Hames & Higgins, Eds. (1984); "Animal Cell Culture", Freshney, Ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes", IRL Press (1986); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning"; the series, Methods in Enzymol., Academic Press, Inc. (1984); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells", Miller and Calos, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1987); y Methods in Enzymology, Vols. 154 y 155, Wu & Grossman, and Wu, Eds., respectivamente.

Los niveles estándar de control del producto de expresión génica, así determinados en los diferentes grupos de control, serían comparados luego con el nivel medido de un producto de expresión génica en un paciente dado. Este producto de expresión génica podría ser el ARNm característico asociado con ese grupo de genotipo particular o el producto de expresión génica polipeptídico de ese grupo de genotipo. El paciente podría ser luego clasificado o asignado a un grupo de genotipo particular con base en que tan similares eran los niveles medios comparados con los niveles de control para un grupo dado.

Como una persona capacitada del arte comprenderá, existirá un cierto grado de incertidumbre involucrado al hacer esta determinación. Por lo tanto, las desviaciones estándar de los niveles del grupo de control serían utilizadas para hacer una determinación probabilística y los métodos serían aplicables sobre un amplio rango de probabilidad con base en las determinaciones del grupo de genotipo. De este modo, por ejemplo y no a manera de limitación, en una modalidad, si el nivel medido del producto de expresión génica cae dentro de desviaciones estándar del promedio de 2,5 de cualquiera de los grupos de control, entonces ese individuo puede ser asignado a ese grupo de genotipo. En otra modalidad sigue el nivel medido del producto de expresión génica cae dentro de desviaciones estándar del promedio de 2,0 de cualquiera de los grupos de control entonces ese individuo puede ser asignado a ese grupo de genotipo. En aún otra modalidad, si el nivel medido del producto de expresión génica cae dentro de desviaciones estándar del promedio de 1,5 de cualquiera de los grupos de control entonces ese individuo puede ser asignado a ese grupo de genotipo. En aún otra modalidad, si el nivel medido del producto de expresión génica es de desviaciones estándar del promedio de 1,0 o menores de cualquiera de los niveles de los grupos de control entonces ese individuo puede ser asignado a ese grupo de genotipo.

Por lo tanto este proceso permitirá a la determinación, con diferentes grados de probabilidad, de en qué grupo debe ser colocado un paciente específico y tal asignación a un grupo de genotipo determinaría entonces la categoría de riesgo dentro de la cual debe ser colocado el individuo.

Los métodos para detectar y medir los niveles de ARNm y los niveles de productos de expresión génica polipeptídicos son bien conocidos en el arte e incluyen el uso de microarreglos de nucleótidos y métodos de detección de polipéptidos que involucran espectrómetros de masas y/o técnicas de detección y cuantificación de anticuerpos. Ver también, Human Molecular Genetics, 2nd Edition. Tom Strachan & Andrew, Read (John Wiley and Sons, Inc. Publication, NY, 1999).

Además, la detección de la concentración del producto de expresión del polipéptido (proteína) del gen en fluidos corporales o tejidos puede ser utilizada para determinar la presencia o la ausencia del polimorfismo, y se puede utilizar el nivel relativo del producto de expresión del polipéptido para determinar si está presente el polimorfismo en un estado homocigoto o heterocigoto y por lo tanto la categoría de riesgo del individuo.

Como se lo utiliza aquí, "condición médica" incluye, pero no se limita a, cualquier condición por enfermedad que se manifiesta como uno o más síntomas físicos y/o psicológicos para los cuales es deseable el tratamiento, e incluye enfermedades y otros trastornos previa y recientemente identificados.

Como se lo utiliza aquí, el término "polimorfismo" significa cualquier variante de secuencia presente con una frecuencia de >1% en una población. La variante de la secuencia puede estar presente con una frecuencia significativamente mayor al 1% tal como 5% ó 10 % ó más. También, se puede utilizar el término para referirse a la variación de la secuencia observada en un individuo en un sitio polimórfico. Los polimorfismos incluyen

sustituciones, inserciones, supresiones y microsátélites de nucleótidos y pueden, pero no necesariamente, dar como resultado diferencias detectables en expresión génica o en la función de la proteína.

Como se lo utiliza aquí, el término "respuesta clínica" significa uno cualquiera por todo de lo siguiente: una medida cuantitativa de la respuesta, sin respuesta y una respuesta adversa, es decir, efectos secundarios.

- 5 Como se lo utiliza aquí, el término "alelo" significa una forma particular de un gen o secuencia de ADN en un sitio cromosómico específico (locus).

Como se lo utiliza aquí, el término "genotipo" significa una secuencia de un par(es) de nucleótidos 5' a 3' desfasados encontrada en uno o más sitios polimórficos en un locus sobre un par de cromosomas homólogos en un individuo. Como se lo utiliza aquí, genotipo incluye un genotipo completo y/o un sub-genotipo.

- 10 Como se lo utiliza aquí, el término "polinucleótido" significa cualquier ARN o ADN, que puede ser ARN o ADN modificado o no modificado. Polinucleótidos incluye, sin limitación, ADN mono y bicatenario, ADN que sea una mezcla de regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario, y ARN que sea una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que contienen ADN y ARN que puede ser monocatenario o, más típicamente, bicatenario o una mezcla de regiones mono y bicatenarias. Además, polinucleótido se refiere a regiones tricatenarias que contienen ARN o ADN o tanto ARN como ADN. El término polinucleótido también incluye los ADN o ARN que contienen una o más bases modificadas y los ADN o ARN con columnas vertebrales modificadas por estabilidad o por otras razones.

- 20 Como se lo utiliza aquí el término "gen" significa un segmento de ADN que contiene toda la información para la biosíntesis regulada de un producto de ARN, incluidos promotores, exones, intrones, y otras regiones no traducidas que controlan la expresión.

- 25 Como se lo utiliza aquí el término "polipéptido" significa cualquier polipéptido que contienen dos o más aminoácidos unidos entre sí por medio de enlaces peptídicos, es decir, isoésteres peptídicos. Polipéptido se refiere tanto a cadenas cortas, comúnmente denominadas como péptidos, glicopéptidos u oligómeros, como a cadenas largas, generalmente denominadas como proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos diferentes a los 20 aminoácidos codificados por el gen. Los polipéptidos incluyen secuencias de aminoácidos modificadas ya sea por medio de procesos naturales, tales como procesamiento post-traduccional, o por medio de técnicas de modificación química que son bien conocidas en el arte. Tales modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en voluminosa literatura investigativa.

- 30 Como se lo utiliza aquí, el término "sitio polimórfico" significa una posición dentro de un locus en el cual al menos dos secuencias alternativas se encuentran en una población, la más frecuente las cuales tiene una frecuencia de no más del 99%.

Como se lo utiliza aquí, el término "par de nucleótidos" significa los nucleótidos encontrados en un sitio polimórfico sobre las dos copias de un cromosoma de un individuo.

- 35 Como se lo utiliza aquí, el término "en fase" significa, cuando se lo aplica a una secuencia de pares de nucleótidos para dos o más sitios polimórficos en un locus, la combinación de nucleótidos presentes en aquellos sitios polimórficos sobre una sola copia del locus es conocida.

- 40 Con el propósito de deducir una correlación entre la respuesta clínica a un tratamiento y un genotipo o haplotipo, es necesario obtener datos sobre las respuestas clínicas exhibidas por una población de individuos que recibieron el tratamiento, en adelante la "población clínica". Éstos datos clínicos pueden ser obtenidos analizando los resultados de un ensayo clínico que ya ha sido realizado y/o se pueden obtener los datos clínicos diseñando y llevando a cabo uno o más ensayos clínicos nuevos.

Como se lo utiliza aquí, el término " ensayo clínico" significa cualquier estudio investigativo diseñado para recolectar datos clínicos sobre respuestas a un tratamiento particular, e incluye, pero no se limita a, ensayos clínicos de Fase I, II y III. Los métodos estándar se utilizan para definir la población de pacientes y para enrolar individuos.

- 45 Como se lo utiliza aquí el término "locus" significa un sitio sobre un cromosoma o una molécula de ADN correspondiente a un gen o a una característica física o fenotípica.

- 50 El tratamiento terapéutico de interés se administra a cada individuo en la población de ensayo y cada respuesta del individuo al tratamiento se mide utilizando uno o más criterios predeterminados. Está contemplado que en muchos casos, la población del ensayo exhibirá un rango de respuestas y que el investigador escogerá el número de grupos de respuesta, por ejemplo, bajo, medio y alto, compuestos por las diferentes respuestas. Además, el gen para cada

individuo en la población de ensayo es genotipificado y/o haplotipificado, lo cual puede hacerse antes o después de administrar el tratamiento.

5 *La detención de ácidos clínicos y de proteínas como marcadores.* En una modalidad particular, se puede determinar el nivel de ARNm correspondiente al marcador tanto en formatos *in situ* como *in vitro* en una muestra biológica utilizando métodos conocidos en el arte. El término "muestra biológica" pretende incluir tejidos, células, fluidos biológicos y aislados de los mismos, aislados de un individuo, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un individuo. Muchos métodos para la detección de la expresión utilizan ARN aislado. Para los métodos *in vitro*, cualquier técnica de aislamiento de ARNm que no seleccionen contra el aislamiento de ARNm puede ser utilizado para la purificación de ARN de las células. Ver, por ejemplo, Ausubel et al., Ed., Curr. Prot. Mol. Biol., John Wiley & Sons, NY (1987 - 1999). Adicionalmente, se pueden procesar fácilmente grandes cantidades de muestras de tejido utilizando técnicas bien conocidas por aquellos capacitados en el arte, tales como, por ejemplo, el proceso de aislamiento del ARN en una sola etapa de la Patente de los Estados Unidos No. 4.843.155.

15 El ARNm aislado puede ser utilizado en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, pero no se limitan a, análisis tipo Southern o Northern, análisis de PCR y arreglos de sondas. Un método preferido de diagnóstico para la detección de los niveles de ARNm implica poner en contacto el ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que puede hibridar al ARNm codificado por el gen que está siendo detectado. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ADNc de longitud completa, o una porción del mismo, tal como un oligonucleótidos de al menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 ó 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridar específicamente bajo condiciones restrictivas a un ARNm o ADN genómico que codifica un marcador. Otras sondas adecuadas para uso en los ensayos de diagnóstico de la invención son descritas aquí. La hibridación de un ARNm con la sonda indica que el marcador en cuestión está siendo expresado.

25 En un formato, se inmoviliza el ARNm sobre una superficie sólida y se lo pone en contacto con una sonda, por ejemplo, corriendo el ARNm aislado sobre un gel de agarosa y transfiriendo el ARNm desde el gel hasta una membrana, tal como nitrocelulosa. En un formato alternativo, la(s) sonda(s) se inmoviliza(n) sobre una superficie sólida y se pone en contacto el ARNm con la(s) sonda(s), por ejemplo, en un arreglo de chips de gene Affymetrix. Una persona capacitada en el arte puede adaptar fácilmente métodos conocidos de detección de ARNm para uso en la detección del nivel del ARNm codificado por los marcadores de la presente divulgación.

30 Un método alternativo para determinar el nivel de ARNm correspondiente a un marcador de la presente divulgación en una muestra involucra el proceso de amplificación del ácido nucleico, por ejemplo, por medio de RT-PCR (la modalidad experimental expuesta en Mullis, Patente De los Estados Unidos No. 4.683.202 (1987); reacción de la cadena de ligasa, Barany (1991), ver más arriba; replicación autosostenida de la secuencia, Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 87, páginas 1874 - 1878 (1990); sistema de amplificación transcripcional, Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, páginas 1173 - 1177 (1989); Q-Beta Replicase, Lizardi et al., Biol. Technology, Vol. 6, p. 1197 (1988); replicación de círculo rodante, Patente de los Estados Unidos No. 5.854.033 (1988); o cualquier otro método de amplificación de ácido nucleico, seguido por la detección de las moléculas amplificadas utilizando técnicas bien conocidas por aquellos capacitados en el arte. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de las moléculas de ácido nucleico si tales moléculas están presentes en cantidades muy bajas. Como se lo utiliza aquí, se definen los iniciadores de amplificación como un par de moléculas de ácido nucleico que pueden hibridar a regiones 5' ó 3' de un gen (hebras más y menos, respectivamente, o viceversa) y contienen una región corta entre ellas. En general, los iniciadores de amplificación son aproximadamente de 10 - 30 nucleótidos de longitud y flanquean una región de aproximadamente 50 - 200 nucleótidos de longitud. Bajo las condiciones apropiadas y con los reactivos apropiados, tales iniciadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos flanqueada por los iniciadores.

45 Para métodos *in situ*, el ARNm no necesita ser aislado de las células antes de la detección. En tales métodos, se prepara/procesa una célula o muestra de tejido utilizando métodos histológicos conocidos. Se inmoviliza luego la muestra sobre un soporte, típicamente una lámina portaobjetos de vidrio, y luego se la pone en contacto con una sonda que puede hibridar a ARNm que codifica el marcador.

50 Como una alternativa a hacer determinaciones basadas en el nivel absoluto de expresión del marcador, las determinaciones pueden basarse en el nivel de expresión normalizado del marcador. Los niveles de expresión se normalizan corrigiendo el nivel de expresión absoluto de un marcador comparando su expresión con la expresión de un gen que no sea un marcador, por ejemplo, un gen de mantenimiento que es constitutivamente expresado. Los genes adecuados para normalización incluyen genes de mantenimiento, tales como el gen para la actina o genes específicos de células epiteliales. Esta normalización permite la comparación del nivel de expresión en una muestra, por ejemplo, una muestra de un paciente, con otra muestra o entre muestras de diferentes fuentes.

55 Alternativamente, el nivel de expresión puede ser suministrado como un nivel de expresión relativo. Para determinar un nivel de expresión relativo de un marcador, se determina el nivel de expresión del marcador para 10 o más

muestras de muestras biológicas normales versus enfermas, preferiblemente 50 o más muestras, antes de la determinación del nivel de expresión para la muestra en cuestión. Se determina el nivel de expresión promedio de cada uno de los genes analizados en el número más grande de muestras y éste es utilizado como el nivel de expresión de línea base para el marcador. El nivel de expresión del marcador determinado para la muestra de prueba (nivel absoluto de expresión) es luego dividido por el valor Promedio de la expresión obtenido para ese marcador. Esto proporciona un nivel de expresión relativo.

Preferiblemente, las muestras utilizadas en la determinación de la línea base serán de pacientes que no tengan el polimorfismo. La escogencia de la fuente de células depende del uso del nivel de expresión relativo. Utilizando la expresión encontrada en tejidos normales como un nivel promedio de expresión ayuda a validar si el marcador analizado es específico (versus las células normales). Además, entre más datos se acumulen, se puede revisar el valor un promedio de la expresión, proveyendo valores de expresión relativos mejorados con base en los datos acumulados.

Detección de polipéptidos. En otra modalidad, se detecta un polipéptido correspondiente a un marcador. Un agente preferido para detección de un polipéptido es un anticuerpo capaz de enlazarse con un polipéptido correspondiente a un marcador de la divulgación, preferiblemente un anticuerpo con una marca detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferiblemente, monoclonales. Se puede utilizar un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo, por ejemplo, Fab o F(ab')₂. El término "marcado", con relación a la sonda o al anticuerpo, se entiende que abarca la marcación directa de la sonda o del anticuerpo por medio de acoplamiento, es decir, enlazando físicamente, una sustancia detectable con la sonda o el anticuerpo, así como marcación indirecta de la sonda o del anticuerpo por medio de la reactividad con otro reactivo que esté marcado directamente. Los ejemplos de marcación indirecta incluyen la detección de un anticuerpo primario utilizando un anticuerpo secundario marcado en forma fluorescente y marcando el extremo de una sonda de ADN con biotina para que pueda ser detectada con estreptavidina marcada en forma fluorescente.

Se pueden aislar proteínas de individuos utilizando técnicas que son bien conocidas por aquellos capacitados en el arte. Los métodos empleados para aislamiento de la proteína, por ejemplo, pueden ser por ejemplo aquellos descritos en Harlow & Lane (1988), ver más arriba.

Se pueden emplear una variedad de formatos para determinar si una muestra contiene una proteína que se enlace con un anticuerpo dado. Los ejemplos de tales formatos incluyen, pero no se limitan a, EIA; radioinmunoensayo (RIA), análisis de transferencias tipo Western y ELISA. Una persona capacitada puede adaptar fácilmente métodos conocidos de detección de proteína /anticuerpo para uso en la determinación de si las células que expresan un marcador de la presente divulgación y la concentración relativa de ese producto específico de expresión del polipéptido en sangre o en otros tejidos corporales.

En un formato, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, pueden ser utilizados en métodos, tales como transferencias tipo Western o técnicas de inmunofluorescencia para detectar las proteínas expresadas. En tales usos, generalmente es preferible inmovilizar ya sea el anticuerpo o las proteínas sobre un soporte sólido. Los soportes o portadores adecuados en fase sólida incluyen cualquier soporte capaz de enlazarse con un antígeno o con un anticuerpo. Los soportes o portadores bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, moléculas de celulosa naturalmente modificadas, poliácridamidas, gabros y magnetita.

Una persona capacitada en el arte conocerá muchos otros portadores adecuados para el lanzamiento de anticuerpo o de antígeno, y será capaz de adaptar tal soporte para uso con la presente invención. Por ejemplo, se puede correr proteína aislada de células de un paciente sobre una electroforesis en gel de poliácridamida e inmovilizarla sobre un soporte en fase sólida, tal como nitrocelulosa. Se puede lavar luego el soporte con amortiguadores adecuados seguido por tratamiento con el anticuerpo marcado en forma detectable. Se puede lavar luego el soporte en fase sólida con el amortiguador una segunda vez para remover el anticuerpo no enlazado. Se puede detectar entonces la cantidad de marcador no enlazado sobre el soporte sólido por medios convencionales y esta medición traducida en un nivel o concentración de proteína en sangre u otro tejido corporal.

La divulgación también abarca kits para detectar la presencia de un polipéptido o ácido nucleico correspondiente a un marcador de la divulgación en una muestra biológica, por ejemplo, cualquier fluido corporal incluyendo, pero sin limitarse a, suero, plasma, linfa, fluido cístico, orina, materia fecal, fluido cerebroespinal, fluido ascítico o sangre e incluyendo muestras de biopsias de tejido corporal. Por ejemplo, el kit puede contener un compuesto marcado o un agente capaz de detectar un polipéptido o un ARNm que codifica un polipéptido correspondiente a un marcador de la divulgación en una muestra biológica y medios para determinar la cantidad del polipéptido o ARNm en la muestra, por ejemplo, un anticuerpo que enlaza al polipéptido o una sonda de oligonucleótido que se enlaza con ADN o ARNm que codifica al polipéptido. Los kits pueden incluir también las instrucciones para interpretar los datos obtenidos utilizando el kit.

Para kits con base en anticuerpos, el kit puede incluir, por ejemplo, 1) un primer anticuerpo, por ejemplo, unido a un soporte sólido, que enlaza a un polipéptido correspondiente a un marcador de la divulgación; y, opcionalmente 2) un segundo anticuerpo diferente que enlaza ya sea al polipéptido o al primer anticuerpo y está conjugado a un marcador detectable.

- 5 Para kits con base en oligonucleótidos, éste puede incluir, por ejemplo, 1) un oligonucleótido, por ejemplo, un oligonucleótido marcado en forma detectable, que hibrida a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido correspondiente a un marcador de la divulgación, o 2) un par de iniciadores útiles para amplificar una molécula de ácido nucleico correspondiente a un marcador de la divulgación.

- 10 El kit puede incluir también, por ejemplo, un agente amortiguador, un preservante o un agente estabilizador de la proteína. El kit puede incluir además los componentes necesarios para detectar el marcador detectable, por ejemplo, una enzima o un sustrato. El kit puede contener también una muestra de control o una serie de muestras de control, que puede ser analizada y comparada con la muestra de prueba. Cada componente del kit puede estar incluido en un recipiente individual y todos los diferentes contenedores pueden estar en un solo empaque, junto con las presiones para interpretar los resultados de los ensayos realizados utilizando el kit.

- 15 *Kits.* Los kits pueden contener un producto escrito sobre o en el contenedor del kit. El producto escrito describe cómo utilizar los reactivos contenidos en el kit para predecir si un paciente responderá efectivamente al tratamiento con macrolactama, especialmente tratamiento con pimecrolimus. En diferentes modalidades, el uso de reactivos puede ser de acuerdo con los métodos de la divulgación.

EJEMPLO

- 20 Análisis farmacogenético de respuesta del paciente a la terapia en un ensayo clínico: asociación potencial de la eficacia del pimecrolimus con polimorfismos en el grupo de genes del TNF

Genes candidatos seleccionados por genotipificación. Cuarenta y seis pacientes, correspondientes a 24 pacientes que recibieron tacrolimus y 22 pacientes que recibieron pimecrolimus, fueron analizados por posibles asociaciones entre marcadores genéticos y la eficacia del tratamiento.

- 25 Se analizaron treinta y un sitios polimórficos únicos en un total de 22 genes. La Tabla 1 enlista las frecuencias genotípicas para cada SNP examinado en la población del ensayo que consintió en participar en el análisis farmacogenético. Cada SNP se identifica por medio de tres piezas de información: (1) REF_ACC, o el número de acceso del GenBank donde se puede encontrar la secuencia genómica para el gen, (2) Posición, que se refiere a la posición del nucleótido dentro del REF_ACC que fue interrogado, y (3) TWT SNP#, que se refiere al número asignado por Third Wave Technologies al ensayo que fue diseñado para evaluar el genotipo en la posición definida por los ítems 1 y 2. La localización se refiere al sitio dentro del gen que alberga el polimorfismo, si se conoce.

Tabla 1

Lista de polimorfismos examinados en el análisis farmacogenómico

Símbolo del gen	Nombre del gen	TWT SNP #	REF ACC	Frecuencia del alelo 1	Frecuencia del alelo 2	Posición	Ubicación
ACE	Enzima que convierte angiotensina I	103199	AF1178569	0.50(T)	0.50(C)	10514	
ACE	Enzima que convierte angiotensina I	103200	AF1178569	0.56(A)	0.44(G)	14521	
CCR2	receptor 2 de quimioquina (motivo CC)	103240	U80924 (SEQ ID NO: 10)	1.0(A)	0.00(G)	4201	3' UTR

(continuación)

<i>Símbolo del gen</i>	Nombre del gen	TWT SNP #	REF ACC	Frecuencia del alelo 1	Frecuencia del alelo 2	Posición	Ubicación
<i>CCR2</i>	receptor 2 de quimioquina (motivo CC)	47987	U80924 (SEQ ID NO: 10)	0.77(G)	0.23(A)	46295	Exón 1
<i>CCR5+</i>	receptor 5 de quimioquina (motivo CC)	128004	U95626	1.00(T)	0.00(A)	61785	Exón 2
<i>CCR5</i>	receptor 5 de quimioquina (motivo CC)	128005	U95626	0.60(A)	0.40(G)	62035	promotor
<i>CTLA4</i>	proteína 4 asociada al linfocito T citotóxico	128016	M74363	0.56(A)	0.44(G)	1241	Exón 1
<i>ICAM1*</i>	molécula 1 de adhesión intercelular	128063	X59287	0.98(A)	0.02(T)	120	Exón 2
<i>ICAM1*</i>	molécula 1 de adhesión intercelular	128062	X59288	0.98(G)	0.02(T)	659	Exón 4
<i>IFNG</i>	Interferón gamma	229376	J00219	0.65(A)	0.35(G)	5644	promotor
<i>IFNGR1+</i>	Receptor 1 del interferón gamma	229419	U19241	1.00(G)	0.00(A)	4020	Exón 1
<i>IFNGR2</i>	Receptor 2 del interferón gamma	252011	AP000113	0.84(A)	0.16(G)	42786	Exón 2
<i>IL10</i>	Interleuquina 10	229400	X78437	0.67(A)	0.33(G)	8210	5'UTR
<i>IL3</i>	Interleuquina 3	251975	AF365976	0.61(C)	0.39(T)	1990	Exón 1
<i>IL3+</i>	Interleuquina 3	229368	AF365976	1.00(T)	0.00(C)	3622	
<i>IL4R</i>	Receptor de Interleuquina 4	229406	AF421857	0.52(C)	0.48(T)	13715	Intrón 5
<i>IL5*</i>	Interleuquina 5	229372	AF353265	0.98(G)	.02(A)	2718	
<i>IL8</i>	Interleuquina 8	229405	AF385628	0.55(C)	0.45(T)	4501	Intrón 2
<i>ITGB2+</i>	Integrina, beta 2 (LFA1)	128081	X64075	1.00(G)	0.00(A)	64	Exón 5
<i>LTA</i>	Linfotoxina alfa	229383	M55913 (SEQ ID NO: 11)	0.59(C)	0.41(A)	800	Exón 3
<i>LTB*</i>	Linfotoxina beta	128095	L11016 (SEQ ID NO: 12)	0.91(C)	0.09(A)	5452	

(continuación)

Símbolo del gen	Nombre del gen	TWT SNP #	REF ACC	Frecuencia del alelo 1	Frecuencia del alelo 2	Posición	Ubicación
<i>MICA</i>	Secuencia A relacionada con el polipéptido MHC clase I	229390	AF336081	0.98(A)	0.02(G)	106	Exón 2
<i>MICA</i>	Secuencia A relacionada con el polipéptido MHC clase I	251974	AF336081	0.78(A)	0.22(G)	1612	Exón 5
<i>MICA</i>	Secuencia A relacionada con el polipéptido MHC clase I	229395	AF336081	0.76(G)	0.24(A)	658	Exón 3
<i>NFATC2</i>	factor nuclear de células T activadas, citoplasmáticas, dependientes de calcineurina 2	252013	AL035682	0.49(A)	0.51(G)	58458	
<i>PLGC1</i>	Fosfolipasa C γ -1	229389	AL022394	0.69(C)	0.31(T)	64001	
<i>TGFB1</i>	Factor de transformación del crecimiento β -1	128146	X05839	0.73(C)	0.27(T)	629	promotor
<i>TNF</i>	Factor α de necrosis tumoral	128152	M16441 (SEQ ID NO: 7)	0.79(T)	0.21(C)	3064	promotor
<i>TNF</i>	Factor α de necrosis tumoral	128150	M16441 (SEQ ID NO: 7)	0.85(C)	0.15(T)	3238	promotor
<i>TNF</i>	Factor α de necrosis tumoral	128148	M16441 (SEQ ID NO: 7)	0.80(G)	0.20(A)	3787	promotor
<i>TNFSF6</i>	Miembro 6 de la superfamilia receptora del factor de necrosis tumoral	128153	X81335	0.58(G)	0.42(A)	1110	promotor

+ Este SNP no es polimórfico en esta población de pacientes.

* Esta población no está en equilibrio de Hardy-Weinberg para este SNP.

5 El gen *FKBP1A* (SEQ ID NO: 13), que codifica para la Proteína 1A de Enlazamiento de FK506 (macrofilina-12), el objetivo de pimecrolimus y tacrolimus (FK506), no fue genotipificado, debido a que se encontró que el gen no contiene SNP. No se han reportado sitios polimórficos en *FKBP1A* en bases de datos públicas. Nosotros secuenciamos el gen *FKBP1A* para buscar SNP desconocidos, pero no encontramos ninguno.

Para interrogar al genotipo en cada locus de interés, se diseñaron grupos de sondas que flanquean al SNP utilizando bases de datos públicamente disponibles tales como OMIM, SNP Consortium, LocusLink y dbSNP. Se

sintetizaron los grupos de sondas por medio de Third Wave Technologies, Inc. (TWT, Madison WI). Se llevó a cabo la genotipificación con 60 ng de ADN genómico utilizando el ensayo Invader® desarrollado por Third Wave Technologies de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Lyamichev V et al., Nat Biotechnol 17: 292 - 6 (1999) y Ryan D, Mol Diagn 4: 135 - 44 (1999).

5 *Genotipificación de ASN60THR LTA.* Para confirmar los resultados del ensayo de genotipificación de Third Wave Technologies para ASN60THR LTA (TWT #229383), se utilizó un enfoque de reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR). Todos los oligonucleótidos fueron adquiridos a Research Genetics (Huntsville, AL). Primero, se amplificó un fragmento de 481 pb utilizando iniciadores con las siguientes secuencias: hacia adelante (5'-acaccacctgaacctcttc-3'; SEQ ID NO: 14) inversa (5'-tctcaatccctgaggaagtgg-3'; SEQ ID NO: 15). Ver el número de acceso del GenBank M55913 para la secuencia completa de LTA (SEQ ID NO: 11). Se purificó el amplicón utilizando columnas Microcon 100 (Amlicon, Beverly, MA) y se utilizó como molde para amplificar un fragmento de 163 pb utilizando iniciadores con las siguientes secuencias: hacia adelante (5'-tcagccaaaccttgagccctagag-3'; SEQ ID NO: 16) e inversa (5'-atgtttaccaatgaggtgagcagcaggttgcgg-3'; SEQ ID NO: 17). Ambas reacciones PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador Perkin-Elmer 9700 utilizando 80 ng de ADN genómico, 60 ng de cada iniciador, 1,0 Unidad (U) de AmpliTaq polimerasa (Perkin-Elmer), y dNTP 200 mM (Pharmacia, Piscataway, N.J.) en un amortiguador que consiste de KCl 50 mM, TRIS-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl 1,5 mM y gelatina al 0,01 %. Los ciclos de PCR para ambas amplificaciones consistieron de lo siguiente: 94°C, 5 min; 94°C, 30 s, 57°C, 30 s, y 72°C, 30 s durante 35 ciclos; 72°C, 10 minutos, luego 4°C. Se dirigió el amplicón de 163 pb con Fau I (New England Biolabs, Beverly MA), y se lo sometió a electroforesis sobre un gel de agarosa al 4%. Un alelo G produjo un fragmento sin cortar de 163 pb, mientras que un A produjo fragmentos de 35 y 128 pb. Tanto el fragmento de 128 como de 163 pb fueron observados en individuos heterocigotos. Todos menos dos de los genotipos determinados por la tecnología de Third Wave Technologies pudo ser confirmada por digestión de restricción.

25 *Genotipificación de TNF (-1031).* Para confirmar los resultados del ensayo de genotipificación para TNF -1031, se amplificó por PCR un fragmento de 1113 pb del promotor del TNF y secuenció para cada muestra. Los iniciadores para PCR tenían las siguientes secuencias: hacia adelante (5'-TGGGAGTGAGAACTTCCCAG-3'; SEQ ID NO: 18) e inversa (5'-TGAGCTCATCTGGAGGAAGC-3'; SEQ ID NO: 19). Ver el número de acceso del GenBank M16441 para la secuencia completa del TNF humano. Se llevaron a cabo las reacciones PCR utilizando las mismas condiciones descritas anteriormente. Se purificaron los productos de la PCR a través de columnas Microcon 100 (Amlicon, Beverly, MA).

30 Después de la purificación del amplicón, se utilizaron 5 ng por 100 pb para secuenciación con el kit ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing según lo recomendado (Perkin Elmer, Foster City, CA). Las reacciones de secuenciación contenían ya sea un iniciador hacia adelante (5'-TGGGAGTGAGAACTTCCCAG-3'; SEQ ID NO: 20) o inverso (5'-CTTAAACGTCCCCTGTATTC-3'; SEQ ID NO: 21) y fueron corridas de la siguiente manera: 96°C, 5 min; 96°C, 10 s, 50°C, 5 s, y 60°C, 4 min durante 25 ciclos; luego 4°C. Las reacciones de secuenciación fueron purificadas con columnas de giro Centrisep (Princeton Separation, Adelphia, NJ) y corridas sobre el secuenciador ABI 373A. Se analizaron las secuencias de ADN utilizando el software ABI Prism Sequence Analysis V3.3.

40 *Análisis estadístico.* Se utilizaron los puntajes de valoración global del investigador (IGA) como marcador primario de eficiencia en los estudios farmacogenéticos. Se utilizaron los puntajes de IGA al final de la fase Ciega del Investigador del ensayo (Día 43) como el momento principal en el tiempo para comparación. La última observación conlleva imputaciones que fueron únicamente requeridas para un individuo el día 43. En este caso, no hubo puntaje IGA disponible después del Día 29, y el puntaje de este fue utilizado en lugar de un puntaje IGA del día 43. Se codificaron nuevamente los puntajes IGA, como se hizo para evaluar la eficacia en el propio ensayo. Un puntaje IGA de 0 ó 1 fue considerado un tratamiento exitoso y puntajes IGA de 2 - 5 fueron considerados como un tratamiento fallido. La severidad del prurito fue utilizada también como un marcador de eficacia. Los puntajes del prurito fueron dicotomizados en ausencia (puntaje = 0) o en presencia (puntaje = 1, 2 ó 3) de prurito. Se empleó el modelo exacto de Fisher para examinar el efecto del genotipo sobre cada variable de eficacia. Todos los análisis estadísticos fueron hechos utilizando software SAS versión 8.2.

50 Para corregir las múltiples pruebas, se aplicó el método de corrección de Bonferroni a todos los resultados. La ecuación utilizada para corregir puntajes significativos (valores p) es: Bonferroni = $P \times \eta$, donde P = valor P para asociación entre el genotipo y la eficacia del tratamiento y η = número de marcadores polimórficos genotipificados en el ensayo.

Datos demográficos de los participantes del ensayo. Como se demuestra en la Tabla 2, los individuos del ensayo que consintieron con el análisis farmacogenómico (PG) eran representativos de la población de pacientes en el ensayo general en términos de género, edad, origen étnico, y respuesta al tratamiento.

55

Tabla 2

Datos demográficos de los participantes del análisis farmacogenómico, comparados con los de los individuos del ensayo

	Muestras farmacogenómicas*			
	Ensayo + tacrolimus	pimecrolimus	tacrolimus	pimecrolimus
Edad (años)	7,8	8,1	8,7	8,5
Raza				
Caucásica	31 (41%)	45 (63%)	12 (48%)	17 (77%)
Negra	14 (20%)	13 (18%)	7 (28%)	4 (18%)
Oriental	4 (6%)	3 (4%)	1 (4%)	0
Otra	21 (30%)	10 (14%)	5 (20%)	1 (5%)
Género				
macho	31 (44%)	31 (44%)	12 (48%)	11 (50%)
hembra	39 (56%)	40 (56%)	14 (52%)	11 (50%)
IGA (línea base) [§]	3: 69	3: 70	3: 24	3: 21
	2: 1	2: 1		2: 1
Eficacia (IGA) [#]	27 (40%)	22 (32%)	13 (52%)	8 (36%)
Prurito (día 1)	0: 1 (1%)	0: 2 (3%)		
	1: 13 (19%)	1: 14 (20%)	1: 6 (24%)	1: 4 (18%)
	2: 33 (47%)	2: 25 (35%)	2: 11 (44%)	2: 9 (41%)
	3: 23 (33%)	3: 30 (42%)	3: 8 (31%)	3: 9 (41%)
Prurito (día 43)	0: 11 (16%)	0: 9 (13%)	0: 5 (20%)	0: 2 (10%)
	1: 35 (50%)	1: 35 (49%)	1: 10 (40%)	1: 14 (67%)
	2: 19 (27%)	2: 15 (21%)	2: 7 (28%)	2: 3 (14%)
	3: 3 (4%)	3: 10 (14%)	3: 3 (12%)	3: 2 (10%)

+ Habían 70 individuos en el ensayo con tacrolimus y 71 individuos en el ensayo con el pimecrolimus

* 24 individuos que tomaron tacrolimus y 22 pacientes que tomaron pimecrolimus fueron analizados en el análisis farmacogenómico.

§ Los puntajes IGA fueron tomados en el cribado.

El número y (porcentaje) de pacientes que experimentaron eficacia, definida como un puntaje IGA de 0 ó 1 registrado el día 43 del tratamiento (fin de la porción ciega del ensayo).

5 *Asociación entre TNF (-1031) y eficacia de la macrolactama.* Como se estableció anteriormente, la variable de eficacia primaria utilizada en análisis estadístico de cada marcador genético fue un puntaje IGA nuevamente codificado. Se genotipificaron un total de 31 loci en 22 genes. De 31 loci que fueron genotipificados, 5 no fueron polimórficos en la población del análisis farmacogenómico y fueron eliminados del análisis. Ver, la Tabla 1, más arriba. Por lo tanto, la penalización para múltiples ensayos en este análisis es de 26.

10 Cuando se analizó el ensayo en conjunto (ambos ensayos combinados), 1 de los 26 SNP analizados mostró una asociación estadísticamente significativa con eficacia. El factor de necrosis tumoral alfa, *TNF*, está localizado en la agrupación MHC rica en genes sobre 6p21.3 (ver, la FIG. 1), y muchos de los genes en esta región juegan papeles importantes en procesos inflamatorios. El promotor de *TNF* es altamente polimórfico. Un SNP localizado -1031 pb del sitio de inicio de la transcripción del gen asociado con eficacia ($p = 0,04$, ver la Tabla 3, más abajo). Estos datos demuestran que los pacientes que albergan un alelo C (ya sea homocigotos CC o heterocigotos CT) en el *TNF* (-1031) eran menos propensos a responder al tratamiento (4/17; tasa de éxito del 24%) que los pacientes TT (17/29; tasa de éxito del 59%).

Tabla 3

Asociación entre TNF (-1031) y la eficacia de la macrolactama

Respuesta al tratamiento	Genotipo del TNF (-1031)			Total
	CC	CT	TT	
Sin éxito (IGA ≥ 2)	2 (67%)	11 (79%)	12 (41%)	25
Éxito (IGA = 0 ó 1)	1 (33%)	3 (21%)	17 (59%)	21
Total	3	14	29	46

15 La Tabla 3 demuestra el número de individuos con cada genotipo que respondió o no al tratamiento (denominado como "éxito" o "sin éxito", respectivamente), de acuerdo a lo determinado por los puntajes IGA el día 43 del tratamiento. Cada cuadrado contiene el número de individuos con el genotipo dado que ajustan la categoría de la respuesta, seguido por el *porcentaje*. El valor P para la asociación es 0,04 (prueba Exact de Fisher).

20 A continuación examinamos la asociación entre *TNF* (-1031) y la eficacia para el tratamiento con tacrolimus y pimecrolimus en forma independiente. Como se observa en la Tabla 4, aquellos individuos que respondieron al pimecrolimus pueden ser aislados de los que no respondieron con base en *TNF* (-1031). Únicamente los individuos con un genotipo TT (SEQ ID NO: 1) con *TNF* (-1031) respondieron al tratamiento con pimecrolimus. Ninguno de los diez individuos con un alelo C (SEQ ID. NO: 2; CC o CT) respondieron al tratamiento con pimecrolimus. Mientras
25 que la tasa de respuesta entre pacientes con CC y CT fue de 0%, 67% de los TT experimentaron remisión de su dermatitis atópica después de tomar pimecrolimus.

Tabla 4

Asociación entre TNF (-1031) y la eficacia del pimecrolimus

Respuesta a pimecrolimus	Genotipo del TNF (-1031)			Total
	CC	CT	TT	
Sin éxito (IGA ≥ 2)	1 (100%)	9 (100%)	4 (33%)	14
Éxito (IGA = 0 ó 1)	0 (0%)	0 (100%)	8 (67%)	8
Total	1	9	12	22

La Tabla 4 muestra el número de individuos tratados con pimecrolimus con cada genotipo que respondieron o no al tratamiento (denominado como " exitoso" o "no exitoso", respectivamente), de acuerdo a lo determinado por los puntajes IGA el día 43 del tratamiento. Cada cuadrado contiene el número de individuos con el genotipo dado que ajustan la categoría de la respuesta, seguido por el *porcentaje*. El valor P para la asociación es de 0,003 (prueba Exact de Fisher).

Sin embargo, el genotipo en este locus no parece influenciar la eficacia del tacrolimus. Ver, la Tabla 5, más abajo. En realidad, de los individuos que utilizaron tacrolimus, los que responden parecen tener la misma probabilidad de ser TT como CT o CC. Por lo tanto, la asociación observada entre la eficacia en el ensayo como un todo y *TNF* (-1031) es válida únicamente para pimecrolimus y no para macrolactamas en general.

Tabla 5

Asociación entre *TNF* (-1031) y la eficacia de tacrolimus

Respuesta a pimecrolimus	Genotipo del <i>TNF</i> (-1031)			Total
	CC	CT	TT	
Sin éxito (IGA \geq 2)	1 (50%)	2 (40%)	8 (47%)	11
Éxito (IGA = 0 ó 1)	1 (50%)	3 (60%)	9 (53%)	13
Total	2	5	17	24

La Tabla 5 muestra el número de individuos tratados con tacrolimus con cada genotipo que respondieron o no al tratamiento (denominado como " exitoso" o "no exitoso", respectivamente), de acuerdo a lo determinado por los puntajes IGA el día 43 del tratamiento. Cada cuadrado contiene el número de individuos con el genotipo dado que ajustan la categoría de la respuesta, seguido por el porcentaje. No se encontró asociación entre la respuesta del genotipo del *TNF* (-1031) al tacrolimus; el valor P para la asociación es de 1,0 (prueba Exact de Fisher).

Asociación entre ASN60THR LTA y la eficacia de la macrolactama. Cuando se analizaron ambos ensayos, se encontró únicamente una asociación con la eficacia con *TNF* (-1031). En forma muy interesante, los datos para un segundo polimorfismo sugirieron una tendencia a ser significativos. Un polimorfismo C→A en el exón 3 de *LTA* (SEQ ID NO: 3), que da como resultado la producción de treonina en vez de asparagina en el aminoácido 60 de la proteína (ASN60THR), fue asociado con eficacia en el ensayo clínico ($p = 0,07$, ver la Tabla 6, más abajo). *LTA* está localizado en tándem con *TNF* sobre 6p21.3, y numerosos reportes sugieren que los marcadores en *TNF* y *LTA* están en fuerte desequilibrio de enlazamiento. Bouma G et al., Scand J Immunol 43: 456 - 63 (1996); Noguchi E et al., Am J Respir Crit Care Med 166: 43 - 6 (2002); Moffatt M & Cookson W. Hum Molec Genet 6: 551 - 4 (1997); Messer G et al., J Exp Med 173: 209 - 19 (1991). Se determinaron los genotipos en este locus en los participantes del análisis farmacogenómico utilizando un Ensayo Invader (TWT#229383) y se confirmó por medio de digestión de restricción. Los datos demuestran que los pacientes que albergan un A, el alelo de tipo silvestre (SEQ ID NO: 3), en este locus eran más propensos a responder al tratamiento; la tasa de respuesta entre individuos con un alelo A (SEQ ID NO: 4); AA o AC) fue del 57% (17/30), mientras que únicamente 25% (4/16) de estos individuos con un genotipo CC experimentó eficacia en el tratamiento.

Tabla 6

Asociación entre ASN60THR LTA y la eficacia de la macrolactama (ambos ensayos combinados)

Respuesta al tratamiento	Genotipo de ASN60THR LTA			Total
	AA	AC	CC	
Sin éxito (IGA \geq 2)	3 (30%)	10 (50%)	12 (75%)	25

(continuación)

Genotipo de ASN60THR <i>LTA</i>				
Respuesta al tratamiento	AA	AC	CC	Total
Éxito (IGA = 0 ó 1)	7 (70%)	10 (50%)	4 (25%)	21
Total	10	20	16	46

5 La Tabla 6 muestra el número de individuos en el ensayo clínico con cada genotipo que respondieron o no al tratamiento (denominado como " exitoso" o "no exitoso", respectivamente), de acuerdo a lo determinado por los puntajes IGA el día 43 del tratamiento. Cada cuadrado contiene el número de individuos con el genotipo dado que ajustan la categoría de la respuesta, seguido por el porcentaje. Aunque no se encontró una asociación significativa (valor $P = 0.07$, prueba Exact de Fisher), el valor P alcanza significación y sugiere una posible asociación.

10 A continuación examinamos la asociación entre ASN60THR *LTA* y cada ensayo clínico en forma independiente. Como se anticipó, se encontró una asociación significativa para pimecrolimus ($P = 0,02$, ver la Tabla 7, más abajo), y se observó un efecto de la dosis con el polimorfismo. Los pacientes con un genotipo CC en este locus respondieron pobremente al pimecrolimus (1/8 u 11% fueron exitosamente tratados). Sin embargo, los pacientes con un genotipo AC respondieron mejor (4/10 ó una tasa de respuesta del 40%), y todos los pacientes con un genotipo AA respondieron al tratamiento (3/3).

15

Tabla 7

Asociación entre ASN60THR *LTA* y la eficacia de pimecrolimus

Genotipo de ASN60THR <i>LTA</i>				
Respuesta al tratamiento	AA	AC	CC	Total
Sin éxito (IGA ≥ 2)	0 (0%)	6 (60%)	8 (89%)	13
Éxito (IGA = 0 ó 1)	3 (100%)	4 (40%)	1 (11%)	7
Total	3	10	9	22

20 La Tabla 7 muestra el número de individuos tratados con pimecrolimus con cada genotipo que respondieron o no al tratamiento (denominado como " exitoso" o "no exitoso", respectivamente), de acuerdo a lo determinado por los puntajes IGA el día 43 del tratamiento. Cada cuadrado contiene el número de individuos con el genotipo dado que ajustan la categoría de la respuesta, seguido por el porcentaje. El valor P para la asociación es de 0,02 (prueba Exact de Fisher).

25 No se encontró una relación similar entre ASN60THR *LTA* y la eficacia del tacrolimus. Como se observa en la Tabla 8, la presencia el alelo A en ASN60THR *LTA* no tuvo influencia sobre la respuesta al tacrolimus. Como s encontró con *TNF* (-1031), la asociación entre ASN60THR*LTA* y la eficacia en el ensayo clínico es impulsada por el ensayo con pimecrolimus.

Tabla 8

Asociación entre ASN60THR LTA y la eficacia de tacrolimus

Genotipo de ASN60THR LTA				
Respuesta al tratamiento	AA	AC	CC	Total
Sin éxito (IGA \geq 2)	3 (43%)	4 (40%)	4 (57%)	11
Éxito (IGA = 0 ó 1)	4 (57%)	6 (60%)	3 (42%)	13
Total	7	10	7	24

5 La Tabla 8 muestra el número de individuos tratados con tacrolimus con cada genotipo que respondieron o no al tratamiento (denominado como " exitoso" o "no exitoso", respectivamente), de acuerdo a lo determinado por los puntajes IGA el día 43 del tratamiento. Cada cuadrado contiene el número de individuos con el genotipo dado que ajustan la categoría de la respuesta, seguido por el porcentaje. No se encontró asociación entre el genotipo de ASN60THR LTA y la respuesta al tacrolimus; el valor P para la asociación es de 1,0 (prueba Exact de Fisher).

10 *Asociación entre marcadores polimórficos y el alivio del prurito.* Una variable secundaria de eficacia utilizada en el ensayo fue el prurito. Se hizo un análisis para observar si ASN60THR LTA y TNF (-1031) se asociaron con esta variable de eficacia (evaluada el día 43). Los resultados de la análisis para ASN60THR LTA y TNF (-1031) se muestran en las Tablas 9 y 10, respectivamente.

15 Poco individuos (7/46) en el grupo farmacogenómico experimentó alivio de la picazón. Los hallazgos para la variable primaria de eficacia (IGA) sugirieron que la presencia de un alelo C en ASN60THR LTA disminuyó la probabilidad de responder al tratamiento. Aunque no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre ASN60THR LTA y el prurito, ningún individuo que fuera CC homocigoto en este locus experimentó alivio de la picazón como resultado del tratamiento en este ensayo. Para TNF (-1031); aunque el análisis de la variable primaria de eficacia IGA sugirió que era mucho más probable que individuos TT respondieran al tratamiento, no puede decirse lo mismo cuando se analizan los puntajes del prurito para el ensayo como un todo. No pueden separarse los dos ensayos para análisis del prurito debido a que el número de los que responden es muy pequeño. Únicamente dos individuos con pimecrolimus en las muestras para análisis farmacogenómico experimentaron alivio de la picazón. Sin embargo, 20 ambos individuos con pimecrolimus que experimentaron eficacia con respecto al prurito eran TT en el TNF (-1031).

Tabla 9

Asociación entre ASN60THR LTA y el prurito (ambos ensayos combinados).

Genotipo de ASN60THR LTA				
Respuesta al tratamiento	AA	AC	CC	Total
Sin éxito (Pru = 1,2,3)	7 (70%)	16 (80%)	16 (100%)	39
Éxito (Pru = 0)	3 (30%)	4 (20%)	0 (0%)	7
Total	10	16	16	46

25 La Tabla 9 muestra el número de individuos con cada genotipo en el locus ASN60THR LTA estudiado que respondieron o no al tratamiento, de acuerdo a lo determinado por los puntajes de prurito el día 43 del tratamiento. El tratamiento fue considerado exitoso si el paciente no reportó prurito (puntaje = 0). Cada cuadrado contiene el número de individuos con el genotipo dado que ajustan la categoría de la respuesta, seguido por el porcentaje. No se encontró una asociación significativa entre el genotipo de ASN60THR LTA y el alivio del prurito (P = 0,06, prueba Exact de Fisher), sin embargo el valor P para la asociación se hizo significativo.

30

Tabla 10

Asociación entre *TNF* (-1031) y el prurito después del tratamiento (ambos ensayos combinados)

Respuesta al tratamiento	Genotipo del <i>TNF</i> (-1031)			Total
	CC	CT	TT	
Sin éxito (Pru = 1,2,3)	3 (100%)	12 (86%)	24 (83%)	39
Éxito (Pru = 0)	0 (0%)	2 (14%)	5 (17%)	7
Total	3	14	29	46

5 La Tabla 10 muestra el número de individuos con cada genotipo en el *TNF* (-1031) que respondieron o no al tratamiento, de acuerdo a lo determinado por los puntajes de prurito el día 43 del tratamiento. El tratamiento fue considerado exitoso si el paciente no reportó prurito (puntaje = 0). Cada cuadrado contiene el número de individuos con el genotipo dado que ajustan la categoría de la respuesta, seguido por el porcentaje. No se encontró asociación (P = 1,0, prueba Exact de Fisher).

10 *Genotipos en TNF (-1031) y ASN60THR LTA.* Se obtuvieron los genotipos de pacientes anónimos en estos dos loci 6p21.3. Únicamente individuos con un genotipo TT en *TNF* (-1031) respondieron a la terapia con pimecrolimus. La observación de que individuos que son homocigotos TT para *TNF* (-1031) son también homocigotos AA, heterocigotos AC, u homocigotos CC o para ASN60THR LTA demuestra que *TNF* (-1031) y ASN60THR no están en completo desequilibrio de enlazamiento.

Tabla 11

Secuencia de nucleótidos que rodea al ASN60THR LTA y polimorfismos del *TNF* (-1031)

Gen	Alelo 1	Alelo 2	Secuencia que rodea
<i>LTA</i>	C	A	GTGAGCAGCAGGTTTGAGG[C,A]TGCTGTGGG CAAGATGCATCTTGGGGTG (SEQ ID NOS: 3 y 4)
<i>TNF</i>	T	C	AGCAAAGGAGAAGCTGAGAAGA[T,C]GAAGG AAAAGTCAGGGTCTGGAGGGGCGGG (SEQ ID NOS: 1 y 2)

15 *Asociaciones entre pimecrolimus y tacrolimus y otros marcadores tipificados.* Se revisaron todos los otros marcadores moleculares tipificados para ver si ellos separaron a los que respondieron de los que no respondieron para cada uno de los ensayos en forma independiente. No se encontraron asociaciones adicionales para pimecrolimus, aunque se encontró una asociación para tacrolimus. Un polimorfismo G→A en la región de codificación de *CCR2* (SEQ ID NO: 6; ver TWT #47987), que da como resultado un cambio en una valina por isoleucina (VAL64ILE), asociado con una respuesta al tratamiento con tacrolimus (p = 0,04, ver la Tabla 12). El valor P para la asociación entre la eficacia del pimecrolimus y VAL64ILE *CCR2* fue de 1,0 (prueba Exact de Fisher).

20

25 *CCR2* codifica al receptor 2 del motivo de quimioquina (C-C), un receptor para la proteína-1 quimioatrayente de monocitos y una quimioquina que media la infiltración de monocitos en enfermedades inflamatorias. *CCR2* codifica para ambas isoformas conocidas del receptor para la proteína-1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1, también conocida como SCYA2), una quimioquina que media específicamente la quimiotaxis de monocitos. MCP-1 ha

mostrado estar involucrado con enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide y la aterosclerosis. Boring L et al., Nature 394: 894 - 7 (1998). El polimorfismo VAL64ILE se presenta en la primera región transmembrana de CCR2 y ha sido estudiado en el contexto de la impresión por el VIH-1 y el SIDA. Mummidi S et al., Nature Med 4: 786 - 93 (1998). La asociación encontrada fue $p = 0,04$.

- 5 Estos datos demuestran que un alelo A en VAL64ILECCR2 era más propenso a responder al tratamiento con tacrolimus; 8/10 u 80% de los individuos AG experimentaron eficacia, comparados con 4/13 ó 31% de los individuos GG. (No había individuos AA en la población). Esta asociación es más débil que las asociaciones observadas con la eficacia del pimecrolimus, particularmente para *TNF* (-1031) y la eficacia del pimecrolimus ($p = 0,003$).

Tabla 12

Asociación entre VAL63ILE CCR2 (TWT# 47987) y la eficacia del tacrolimus

Genotipo de VAL63ILE CCR2				
Respuesta al tacrolimus	AA	AG	GG	Total
Sin éxito (IGA \geq 2)	0	2 (20%)	9 (69%)	11
Éxito (IGA = 0 ó 1)	0	8 (80%)	4 (31%)	12
Total	0	10	13	23

10

La Tabla 12 muestra el número de individuos tratados con tacrolimus con cada genotipo en VAL63ILE CCR2 que respondieron y no respondieron al tratamiento (determinado por medio de los puntajes IGA el día 43 del tratamiento). Cada cuadrado contiene el número de individuos con el genotipo dado que ajustan la categoría de la respuesta, seguido por el porcentaje. El valor P para la asociación fue de 0,04 (prueba Exact de Fisher).

- 15 *LTB* (SEQ ID NO 12; ver TWT # 125095) está también localizado en la agrupación de genes para el *TNF* sobre 6p21.3. Se tipificó también un polimorfismo en *LTB* en este análisis (SEQ ID NO: 22). Como se muestra más adelante, sin embargo, no existe asociación entre TWT#125095 y la eficacia en el ensayo clínico. No se encontró asociación cuando se analizaron independientemente individuos tratados con pimecrolimus y tacrolimus, tampoco.

Tabla 13

Relación entre la eficacia en el ensayo (ambos ensayos combinados) y *LTB* (TWT#128095); los datos no demuestran asociación ($p = 1,0$, prueba Exact de Fisher)

<i>LTB</i> (TWT#128095)			
Respuesta al tratamiento	AC	CC	Total
Sin éxito (IGA \geq 2)	3 (50%)	20 (54%)	23
Éxito (IGA = 0 ó 1)	3 (50%)	17 (46%)	20
Total	16	26	43

20

Tabla 14

Relación entre la eficacia en individuos tratados con pimecrolimus y *LTB* (TWT#128095); los datos no demuestran asociación ($p = 1,0$, prueba Exact de Fisher)

<i>LTB</i> (TWT#128095)			
Respuesta al pimecrolimus	AC	CC	Total
Sin éxito (IGA ≥ 2)	0 (50%)	12 (63%)	12
Éxito (IGA = 0 ó 1)	1 (100%)	7 (37%)	8
Total	1	19	20

Tabla 15

Relación entre la eficacia en individuos tratados con tacrolimus y *LTB* (TWT#128095); los datos no demuestran asociación ($p = 1,0$, prueba Exact de Fisher)

<i>LTB</i> (TWT#128095)			
Respuesta al tacrolimus	AC	CC	Total
Sin éxito (IGA ≥ 2)	3 (60%)	8 (44%)	11
Éxito (IGA = 0 ó 1)	2 (40%)	10 (56%)	12
Total	5	18	23

- 5 Estos datos ayudan a alcanzar la región genética que es responsable por la respuesta al pimecrolimus; el polimorfismo biológicamente relevante no parece estar localizado cerca al *TNF*.

10 En resumen, tanto *LTA* como *TNF* juegan un papel importante en la determinación de la eficacia del pimecrolimus en el tratamiento de dermatitis atópica pediátrica. Por el contrario, la respuesta al tacrolimus parece estar influenciada por otras rutas biológicas. De este modo, diferentes mecanismos biológicos influyen en la respuesta al pimecrolimus y al tacrolimus. Aunque el pimecrolimus y el tacrolimus tienen sustanciales similitudes estructurales y ambos tienen como objetivo la macrofilina-12 con el propósito último de inhibir la calcineurina, se sabe que los dos compuestos tienen distintas propiedades. Nghiem P et al., *J Am Acad Dermatol* 46: 228 - 241 (2002) y las referencias citadas allí.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novartis AG

- 15 McCullough, Karen

Ide, Susan

Lavedan, Christian

<120> USO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS QUE SE ASOCIAN CON LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO DE UNA ENFERMEDAD INFLAMATORIA

- 20 <130> DV/4-33389A

<150> 60/508,971 <151> 2003-10-06

<160> 22

<170> FastSEQ para windows versión 4.0

<210> 1

<211> 53

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> variación

<222> (1)...(53)

10 <223> variante del locus del TNF (T en posición -1031)

<221> variación

<222> (23)...(0)

<223> T

<400> 1

15 agcaaaggag aagctgagaa gatgaaggaa aagtcagggt ctggaggggc ggg 53

<210> 2

<211> 53

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20 <220>

<221> variación

<222> (1)...(53)

<223> variante del locus del TNF (C en posición -1031)

<221> variación

25 <222> (23)...(0)

<223> C

<400> 2

agcaaaggag aagctgagaa gacgaaggaa aagtcagggt ctggaggggc ggg 53

<210> 3

30 <211> 48

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> variación

5 <222> (1)...(48)

<223> variante del locus de LTA (C)

<221> variación

<222> (20)...(0)

<223> C

10 <400> 3

gtgagcagca ggtttgaggc tgctgtgggc aagatgcatc ttggggtg 48

<210> 4

<211> 48

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<220>

<221> variación

<222> (1)...(48)

<223> variante del locus de LTA (A; ASN60THR)

20 <221> variación

<222> (20)...(0)

<223> A

<400> 4

gtgagcagca ggtttgagga tgctgtgggc aagatgcatc ttggggtg 48

25 <210> 5

<211> 50

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

30 <221> variación

<222> (1)...(50)

<223> variante del locus de CCR2 (G)

<221> variación

<222> (10)...(0)

5 <223> G

<400> 5

atgctggtcg tcctcatctt aataaactgc aaaaagctga agtgcttgac 50

<210> 6

<211> 50

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> variación

<222> (1)...(50)

15 <223> variante del locus de CCR2 (A; VAL64ILE)

<221> variación

<222> (10)...(0)

<223> A

<400> 6

20 atgctggtca tcctcatctt aataaactgc aaaaagctga agtgcttgac 50

<210> 7

<211> 702

<212> ADN

<213> Homo sapiens

25 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(702)

<223> Región de codificación del ARNm del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa)

<400> 7

30

atg agc act gaa agc atg atc cgg gac gtg gag ctg gcc gag gag gcg 48

Met 1	Ser	Thr	Glu	Ser 5	Met	Ile	Arg	Asp	Val 10	Glu	Leu	Ala	Glu	Glu 15	Ala		
ctc Leu	ccc Pro	aag Lys	aag Lys 20	aca Thr	ggg Gly	ggg Gly	ccc Pro	cag Gln 25	ggc Gly	tcc Ser	agg Arg	cgg Arg	tgc Cys 30	ttg Leu	ttc Phe		96
ctc Leu	agc Ser	ctc Leu 35	ttc Phe	tcc Ser	ttc Phe	ctg Leu	atc Ile 40	gtg Val	gca Ala	ggc Gly	gcc Ala	acc Thr 45	acg Thr	ctc Leu	ttc Phe		144
tgc Cys	ctg Leu 50	ctg Leu	cac His	ttt Phe	gga Gly	gtg Val 55	atc Ile	ggc Gly	ccc Pro	cag Gln	agg Arg 60	gaa Glu	gag Glu	ttc Phe	ccc Pro		192
agg Arg 65	gac Asp	ctc Leu	tct Ser	cta Leu	atc Ile 70	agc Ser	cct Pro	ctg Leu	gcc Ala	cag Gln 75	gca Ala	gtc Val	aga Arg	tca Ser	tct Ser 80		240
tct Ser	cga Arg	acc Thr	ccg Pro	agt Ser 85	gac Asp	aag Lys	cct Pro	gta Val	gcc Ala 90	cat His	gtt Val	gta Val	gca Ala	aac Asn 95	cct Pro		288
caa Gln	gct Ala	gag Glu	ggg Gly 100	cag Gln	ctc Leu	cag Gln	tgg Trp	ctg Leu 105	aac Asn	cgc Arg	cgg Arg	gcc Ala	aat Asn 110	gcc Ala	ctc Leu		336
ctg Leu	gcc Ala	aat Asn 115	ggc Gly	gtg Val	gag Glu	ctg Leu	aga Arg 120	gat Asp	aac Asn	cag Gln	ctg Leu	gtg Val 125	gtg Val	cca Pro	tca Ser		384
gag Glu	ggc Gly 130	ctg Leu	tac Tyr	ctc Leu	atc Ile	tac Tyr 135	tcc Ser	cag Gln	gtc Val	ctc Leu	ttc Phe 140	aag Lys	ggc Gly	caa Gln	ggc Gly		432
tgc Cys 145	ccc Pro	tcc Ser	acc Thr	cat His	gtg Val 150	ctc Leu	ctc Leu	acc Thr	cac His	acc Thr 155	atc Ile	agc Ser	cgc Arg	atc Ile	gcc Ala 160		480
gtc Val	tcc Ser	tac Tyr	cag Gln	acc Thr 165	aag Lys	gtc Val	aac Asn	ctc Leu	ctc Leu 170	tct Ser	gcc Ala	atc Ile	aag Lys	agc Ser 175	ccc Pro		528
tgc Cys	cag Gln	agg Arg	gag Glu 180	acc Thr	cca Pro	gag Glu	ggg Gly	gct Ala 185	gag Glu	gcc Ala	aag Lys	ccc Pro	tgg Trp 190	tat Tyr	gag Glu		576
ccc Pro	atc Ile	tat Tyr 195	ctg Leu	gga Gly	ggg Gly	gtc Val	ttc Phe 200	cag Gln	ctg Leu	gag Glu	aag Lys	ggt Gly 205	gac Asp	cga Arg	ctc Leu		624
agc Ser	gct Ala 210	gag Glu	atc Ile	aat Asn	cgg Arg	ccc Pro 215	gac Asp	tat Tyr	ctc Leu	gac Asp	ttt Phe 220	gcc Ala	gag Glu	tct Ser	ggg Gly		672
cag Gln 225	gtc Val	tac Tyr	ttt Phe	ggg Gly	atc Ile 230	att Ile	gcc Ala	ctg Leu	tga *								702

<210> 8

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 8

```

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
 1          5          10          15

Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe
          20          25          30
Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
          35          40          45
Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro
          50          55          60
Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser
          65          70          75          80
Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro
          85          90          95
Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu
          100          105          110
Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser
          115          120          125
Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly
          130          135          140
Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala
          145          150          155          160
Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro
          165          170          175
Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu
          180          185          190
Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu
          195          200          205
Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly
          210          215          220
Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
          225          230

```

<210> 9

<211> 1793

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (74)...(1201)

15 <223> Región de codificación del ARN para expresión de beta-actina (ACTB)

<400> 9

cgcgctccgcc	ccgcgagcac	agagcctcgc	ctttgccgat	ccgccgcccg	tccacacccg	60
ccgccagctc	acc atg gat gat gat atc gcc gcg ctc gtc gtc gac aac	109				
	Met Asp Asp Asp Ile Ala Ala Leu Val Val Asp Asn					
	1 5 10					
ggc tcc ggc atg tgc aag gcc ggc ttc gcg ggc gac gat gcc ccc cgg	157					
Gly Ser Gly Met Cys Lys Ala Gly Phe Ala Gly Asp Asp Ala Pro Arg						
	15 20 25					
gcc gtc ttc ccc tcc atc gtg ggg cgc ccc agg cac cag ggc gtg atg	205					
Ala Val Phe Pro Ser Ile Val Gly Arg Pro Arg His Gln Gly Val Met						
	30 35 40					
gtg ggc atg ggt cag aag gat tcc tat gtg ggc gac gag gcc cag agc	253					
Val Gly Met Gly Gln Lys Asp Ser Tyr Val Gly Asp Glu Ala Gln Ser						
	45 50 55 60					
aag aga ggc atc ctc acc ctg aag tac ccc atc gag cac ggc atc gtc	301					
Lys Arg Gly Ile Leu Thr Leu Lys Tyr Pro Ile Glu His Gly Ile Val						
	65 70 75					
acc aac tgg gac gac atg gag aaa atc tgg cac cac acc ttc tac aat	349					
Thr Asn Trp Asp Asp Met Glu Lys Ile Trp His His Thr Phe Tyr Asn						
	80 85 90					
gag ctg cgt gtg gct ccc gag gag cac ccc gtg ctg ctg acc gag gcc	397					
Glu Leu Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Val Leu Leu Thr Glu Ala						

			95			100			105							
ccc Pro	ctg Leu 110	aac Asn	ccc Pro	aag Lys	gcc Ala	aac Asn 115	cgc Arg	gag Glu	aag Lys	atg Met	acc Thr 120	cag Gln	atc Ile	atg Met	ttt Phe	445
gag Glu 125	acc Thr	ttc Phe	aac Asn	acc Thr	cca Pro 130	gcc Ala	atg Met	tac Tyr	ggt Val	gct Ala 135	atc Ile	cag Gln	gct Ala	gtg Val	cta Leu 140	493
tcc Ser	ctg Leu	tac Tyr	gcc Ala	tct Ser 145	ggc Gly	cg Arg	acc Thr	act Thr	ggc Gly 150	atc Ile	gtg Val	atg Met	gac Asp	tcc Ser 155	ggt Gly	541
gac Asp	ggg Gly	gtc Val	acc Thr 160	cac His	act Thr	gtg Val	ccc Pro	atc Ile 165	tac Tyr	gag Glu	ggg Gly	tat Tyr	gcc Ala 170	ctc Leu	ccc Pro	589
cat His	gcc Ala	atc Ile 175	ctg Leu	cg Arg	ctg Leu	gac Asp	ctg Leu 180	gct Ala	ggc Gly	cg Arg	gac Asp	ctg Leu 185	act Thr	gac Asp	tac Tyr	637
ctc Leu	atg Met 190	aag Lys	atc Ile	ctc Leu	acc Thr	gag Glu 195	cg Arg	ggc Gly	tac Tyr	agc Ser	ttc Phe 200	acc Thr	acc Thr	acg Thr	gcc Ala	685
gag Glu 205	cg Arg	gaa Glu	atc Ile	gtg Val	cg Arg 210	gac Asp	att Ile	aag Lys	gag Glu	aag Lys 215	ctg Leu	tgc Cys	tac Tyr	gtc Val	gcc Ala 220	733
ctg Leu	gac Asp	ttc Phe	gag Glu	caa Gln 225	gag Glu	atg Met	gcc Ala	acg Thr	gct Ala 230	gct Ala	tcc Ser	agc Ser	tcc Ser	tcc Ser 235	ctg Leu	781
gag Glu	aag Lys	agc Ser	tac Tyr 240	gag Glu	ctg Leu	cct Pro	gac Asp	ggc Gly 245	cag Gln	gtc Val	atc Ile	acc Thr	att Ile 250	ggc Gly	aat Asn	829
gag Glu	cg Arg	ttc Phe 255	cg Arg	tgc Cys	cct Pro	gag Glu	gca Ala 260	ctc Leu	ttc Phe	cag Gln	cct Pro	tcc Ser 265	ttc Phe	ctg Leu	ggc Gly	877
atg Met	gag Glu 270	tcc Ser	tgt Cys	ggc Gly	atc Ile	cac His 275	gaa Glu	act Thr	acc Thr	ttc Phe	aac Asn 280	tcc Ser	atc Ile	atg Met	aag Lys	925
tgt Cys 285	gac Asp	gtg Val	gac Asp	atc Ile	cg Arg 290	aaa Lys	gac Asp	ctg Leu	tac Tyr	gcc Ala 295	aac Asn	aca Thr	gtg Val	ctg Leu	tct Ser 300	973
ggc Gly	ggc Gly	acc Thr	acc Thr	atg Met 305	tac Tyr	cct Pro	ggc Gly	att Ile	gcc Ala 310	gac Asp	agg Arg	atg Met	cag Gln	aag Lys 315	gag Glu	1021
atc Ile	act Thr	gcc Ala	ctg Leu 320	gca Ala	ccc Pro	agc Ser	aca Thr	atg Met 325	aag Lys	atc Ile	aag Lys	atc Ile	att Ile 330	gct Ala	cct Pro	1069
cct Pro	gag Glu	cg Arg 335	aag Lys	tac Tyr	tcc Ser	gtg Val 340	tgg Trp	atc Ile	ggc Gly	ggc Gly	tcc Ser	atc Ile 345	ctg Leu	gcc Ala	tcg Ser	1117
ctg Leu	tcc Ser 350	acc Thr	ttc Phe	cag Gln	cag Gln	atg Met 355	tgg Trp	atc Ile	agc Ser	aag Lys	cag Gln 360	gag Glu	tat Tyr	gac Asp	gag Glu	1165
tcc Ser	ggc Gly	ccc Pro	tcc Ser	atc Ile	gtc Val	cac His	cg Arg	aaa Lys	tgc Cys	ttc Phe	tag *	gcggactatg			1211	

365	370	375				
acttagttgc	gttacaccct	ttcttgacaa	aacctaacct	gcgcagaaaa	caagatgaga	1271
ttggcatggc	tttatttggt	ttttttggtt	tgttttgggt	tttttttttt	ttttggcttg	1331
actcaggatt	taaaaactgg	aacgggtgaag	gtgacagcag	tcggttggag	cgagcatccc	1391
ccaaagttca	caatgtggcc	gaggactttg	attgcacatt	gttggttttt	taatagtcac	1451
tccaaatgat	agatgcattg	ttacaggaag	tcccttgcca	tcctaaaagc	caccccactt	1511
ctctctaagg	agaatggccc	agtcctctcc	caagtccaca	caggggaggt	gatagcattg	1571
ctttcgtgta	aattatgtaa	tgcaaaaattt	ttttaatcct	cgccttaata	cttttttatt	1631
ttgttttatt	ttgaatgatg	agccttcgtg	cccccccttc	cccctttttg	tcccccaact	1691
tgagatgtat	gaaggctttt	ggtctccctg	ggagtgggtg	gaggcagcca	gggcttacct	1751
gtacactgac	ttgagaccag	ttgaataaaa	gtgcacacct	ta		1793

<210> 10

<211> 2242

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (51)...(991)

<223> Región de codificación del ARNm del receptor 2 (CCR2) de quimioquina (motivo CC)

10 <400> 10

acagagaaag tggattgaac aaggacgcat ttccccagta catccacaac atg ctg	56
	Met Leu 1
tcc aca tct cgt tct cgg ttt atc aga aat acc aac gag agc ggt gaa	104
Ser Thr Ser Arg Ser Arg Phe Ile Arg Asn Thr Asn Glu Ser Gly Glu	5 10 15
gaa gtc acc acc ttt ttt gat tat gat tac ggt gct ccc tgt cat aaa	152
Glu Val Thr Thr Phe Phe Asp Tyr Asp Tyr Gly Ala Pro Cys His Lys	20 25 30
ttt gac gtg aag caa att ggg gcc caa ctc ctg cct ccg ctc tac tcg	200
Phe Asp Val Lys Gln Ile Gly Ala Gln Leu Leu Pro Pro Leu Tyr Ser	35 40 45 50
ctg gtg ttc atc ttt ggt ttt gtg ggc aac atg ctg gtc gtc ctc atc	248
Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn Met Leu Val Val Leu Ile	55 60 65
tta ata aac tgc aaa aag ctg aag tgc ttg act gac att tac ctg ctc	296
Leu Ile Asn Cys Lys Lys Leu Lys Cys Leu Thr Asp Ile Tyr Leu Leu	70 75 80
aac ctg gcc atc tct gat ctg ctt ttt ctt att act ctc cca ttg tgg	344
Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Ile Thr Leu Pro Leu Trp	85 90 95
gct cac tct gct gca aat gag tgg gtc ttt ggg aat gca atg tgc aaa	392
Ala His Ser Ala Ala Asn Glu Trp Val Phe Gly Asn Ala Met Cys Lys	100 105 110
tta ttc aca ggg ctg tat cac atc ggt tat ttt ggc gga atc ttc ttc	440
Leu Phe Thr Gly Leu Tyr His Ile Gly Tyr Phe Gly Gly Ile Phe Phe	115 120 125 130
atc atc ctc ctg aca atc gat aga tac ctg gct att gtc cat gct gtg	488
Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val	135 140 145
ttt gct tta aaa gcc agg acg gtc acc ttt ggg gtg gtg aca agt gtg	536
Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Val Thr Ser Val	150 155 160

atc acc tgg ttg gtg gct gtg ttt gct tct gtc cca gga atc atc ttt Ile Thr Trp 165 Leu Val Ala Val Phe 170 Ala Ser Val Pro Gly 175 Ile Ile Phe	584
act aaa tgc cag aaa gaa gat tct gtt tat gtc tgt ggc cct tat ttt Thr Lys 180 Cys Gln Lys Glu Asp 185 Ser Val Tyr Val Cys 190 Gly Pro Tyr Phe	632
cca cga gga tgg aat aat ttc cac aca ata atg agg aac att ttg ggg Pro Arg Gly Trp Asn Asn 200 Phe His Thr Ile Met 205 Arg Asn Ile Leu Gly 210	680
ctg gtc ctg ccg ctg ctc atc atg gtc atc tgc tac tgc gga atc ctg Leu Val Leu Pro 215 Leu Leu Ile Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile Leu 225	728
aaa acc ctg ctt cgg tgt cga aac gag aag aag agg cat agg gca gtg Lys Thr Leu 230 Leu Arg Cys Arg Asn Glu 235 Lys Lys Arg His Arg Ala Val	776
aga gtc atc ttc acc atc atg att gtt tac ttt ctc ttc tgg act ccc Arg Val Ile 245 Phe Thr Ile Met Ile 250 Val Tyr Phe Leu Phe 255 Trp Thr Pro	824
tat aac att gtc att ctc ctg aac acc ttc cag gaa ttc ttc ggc ctg Tyr Asn Ile Val Ile Leu Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly Leu 270	872
agt aac tgt gaa agc acc agt caa ctg gac caa gcc acg cag gtg aca Ser Asn Cys Glu Ser 280 Thr Ser Gln Leu Asp Gln Ala Thr Gln Val Thr 290	920
gag act ctt ggg atg act cac tgc tgc atc aat ccc atc atc tat gcc Glu Thr Leu Gly Met 295 Thr His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala 305	968
ttc gtt ggg gag aag ttc aga ag cctttttcac atagctcttg gctgtaggat Phe Val Gly 310 Glu Lys Phe Arg	1021
tgccccactc caaaaaccag tgtgtggagg tccaggagtg agaccaggaa agaatgtgaa 1081	
agtgactaca caaggactcc tcgatggtcg tggaaaagga aagtcaattg gcagagcccc 1141	
tgaagccagt cttcaggaca aagaaggagc ctagagacag aaatgacaga tctctgcttt 1201	
ggaaatcaca cgtctggcct cacagatgtg tgattcacag tgtgaatctt ggtgtctacg 1261	
ttaccaggca ggaaggctga gaggagagag actccagctg ggttggaaaa cagtattttc 1321	
caaactacct tccagttcct cttttttgaa tacaggcata gagttcagac tttttttaa 1381	
tagtaaaaat aaaattaaag ctgaaaactg caacttgtaa atgtggtaaa gagttagttt 1441	
gagttactat catgtcaaac gtgaaaatgc tgtattagtc acagagataa ttctagcttt 1501	
gagcttaaga attttgagca ggtggtatgt ttgggagact gctgagtcaa cccaatagtt 1561	
gttgattggc aggagtggga agtgtgtgat ctgtggcac attagcctat gtgcatgcag 1621	
catctaagta atgatgtcgt ttgaatcaca gtatacgctc catcgcctgtc atctcagctg 1681	
gatctccatt ctctcaggct tgctgcaaaa agccttttgt gttttgtttt gtatcattat 1741	
gaagtcatgc gtttaatcac attcgagtgt ttcagtgctt cgcagatgtc cttgatgtc 1801	
atattgttcc ctattttgcc agtgggaact cctaaatcaa attggcttct aatcaaagct 1861	
tttaaaccct attggtaaag aatggaaggt ggagaagctc cctgaagtaa gcaaagactt 1921	
tcctcttagt cgagccaagt taagaatggt cttatgttgc ccagtgtgtt tctgactga 1981	
tgcaagtaag aaacactggg cttctagaac caggcaactt gggaaactaga ctccaagct 2041	
ggactatggc tctactttca ggccacatgg ctaaagaagg tttcagaaag aagtggggac 2101	
agagcagaac tttcaccttc atatatattgt atgaccta tgaatgcata aaatgttaag 2161	
ttgatggtga tgaatgtaa atactgttt taacaactat gatttgaaa ataatcaat 2221	
gctataacta tgttgataaa a	2242

<210> 11

<211> 618

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)...(618)

<223> Región de codificación del ARNm para linfotoxina alfa (LTA)

<400> 11

atg	aca	cca	cct	gaa	cgt	ctc	ttc	ctc	cca	agg	gtg	tgt	ggc	acc	acc	48
Met	Thr	Pro	Pro	Glu	Arg	Leu	Phe	Leu	Pro	Arg	Val	Cys	Gly	Thr	Thr	
1				5					10					15		
cta	cac	ctc	ctc	ctt	ctg	ggg	ctg	ctg	ctg	ggt	ctg	ctg	cct	ggg	gcc	96
Leu	His	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Pro	Gly	Ala	
			20					25					30			
cag	ggg	ctc	cct	ggt	ggt	ggc	ctc	aca	cct	tca	gct	gcc	cag	act	gcc	144
Gln	Gly	Leu	Pro	Gly	Val	Gly	Leu	Thr	Pro	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Ala	
		35					40					45				
cgt	cag	cac	ccc	aag	atg	cat	ctt	gcc	cac	agc	acc	ctc	aaa	cct	gct	192
Arg	Gln	His	Pro	Lys	Met	His	Leu	Ala	His	Ser	Thr	Leu	Lys	Pro	Ala	
	50					55					60					
gct	cac	ctc	att	gga	gac	ccc	agc	aag	cag	aac	tca	ctg	ctc	tgg	aga	240
Ala	His	Leu	Ile	Gly	Asp	Pro	Ser	Lys	Gln	Asn	Ser	Leu	Leu	Trp	Arg	
65				70					75						80	
gca	aac	acg	gac	cgt	gcc	ttc	ctc	cag	gat	ggt	ttc	tcc	ttg	agc	aac	288
Ala	Asn	Thr	Asp	Arg	Ala	Phe	Leu	Gln	Asp	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Asn	
				85					90					95		
aat	tct	ctc	ctg	gtc	ccc	acc	agt	ggc	atc	tac	ttc	gtc	tac	tcc	cag	336
Asn	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Thr	Ser	Gly	Ile	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Gln	
			100					105					110			
gtg	gtc	ttc	tct	ggg	aaa	gcc	tac	tct	ccc	aag	gcc	acc	tcc	tcc	cca	384
Val	Val	Phe	Ser	Gly	Lys	Ala	Tyr	Ser	Pro	Lys	Ala	Thr	Ser	Ser	Pro	
		115					120					125				
ctc	tac	ctg	gcc	cat	gag	gtc	cag	ctc	ttc	tcc	tcc	cag	tac	ccc	ttc	432
Leu	Tyr	Leu	Ala	His	Glu	Val	Gln	Leu	Phe	Ser	Ser	Gln	Tyr	Pro	Phe	
	130				135						140					
cat	gtg	cct	ctc	ctc	agc	tcc	cag	aag	atg	gtg	tat	cca	ggg	ctg	cag	480
His	Val	Pro	Leu	Leu	Ser	Ser	Gln	Lys	Met	Val	Tyr	Pro	Gly	Leu	Gln	
145					150					155					160	
gaa	ccc	tgg	ctg	cac	tcg	atg	tac	cac	ggg	gct	gcg	ttc	cag	ctc	acc	528
Glu	Pro	Trp	Leu	His	Ser	Met	Tyr	His	Gly	Ala	Ala	Phe	Gln	Leu	Thr	
				165					170					175		
cag	gga	gac	cag	cta	tcc	acc	cac	aca	gat	ggc	atc	ccc	cac	cta	gtc	576
Gln	Gly	Asp	Gln	Leu	Ser	Thr	His	Thr	Asp	Gly	Ile	Pro	His	Leu	Val	
			180					185					190			
ctc	agc	cct	agt	act	gtc	ttc	ttt	gga	gcc	ttc	gct	ctg	tag			618
Leu	Ser	Pro	Ser	Thr	Val	Phe	Phe	Gly	Ala	Phe	Ala	Leu	*			
		195					200					205				

<210> 12

<211> 894

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (9)...(743)

<223> Región de codificación del ARNm para linfotoxina beta (LTB)

<400> 12

<210> 13

<211> 327

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(327)

<223> Marco de lectura abierto de FKBP1A para la región de codificación del ARNm para la Proteína 1A que Enlaza con FK506 (macrofilina-12)

10 <400> 13

atg	gga	gtg	cag	gtg	gaa	acc	atc	tcc	cca	gga	gac	ggg	cgc	acc	ttc	48
Met	Gly	Val	Gln	Val	Glu	Thr	Ile	Ser	Pro	Gly	Asp	Gly	Arg	Thr	Phe	
1				5					10					15		
ccc	aag	cgc	ggc	cag	acc	tgc	gtg	gtg	cac	tac	acc	ggg	atg	ctt	gaa	96
Pro	Lys	Arg	Gly	Gln	Thr	Cys	Val	Val	His	Tyr	Thr	Gly	Met	Leu	Glu	
			20					25					30			
gat	gga	aag	aaa	ttt	gat	tcc	tcc	cgg	gac	aga	aac	aag	ccc	ttt	aag	144
Asp	Gly	Lys	Lys	Phe	Asp	Ser	Ser	Arg	Asp	Arg	Asn	Lys	Pro	Phe	Lys	
		35					40					45				
ttt	atg	cta	ggc	aag	cag	gag	gtg	atc	cga	ggc	tgg	gaa	gaa	ggg	gtt	192
Phe	Met	Leu	Gly	Lys	Gln	Glu	Val	Ile	Arg	Gly	Trp	Glu	Glu	Gly	Val	
	50					55					60					
gcc	cag	atg	agt	gtg	ggt	cag	aga	gcc	aaa	ctg	act	ata	tct	cca	gat	240
Ala	Gln	Met	Ser	Val	Gly	Gln	Arg	Ala	Lys	Leu	Thr	Ile	Ser	Pro	Asp	
	65				70				75						80	
tat	gcc	tat	ggt	gcc	act	ggg	cac	cca	ggc	atc	atc	cca	cca	cat	gcc	288
Tyr	Ala	Tyr	Gly	Ala	Thr	Gly	His	Pro	Gly	Ile	Ile	Pro	Pro	His	Ala	
				85					90					95		
act	ctc	gtc	ttc	gat	gtg	gag	ctt	cta	aaa	ctg	gaa	tga				327
Thr	Leu	Val	Phe	Asp	Val	Glu	Leu	Leu	Lys	Leu	Glu	*				
			100				105									

<210> 14

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<220>

<221> iniciador_enlace

<222> (1)...(21)

<223> Iniciador de amplificación para LTA humano - hacia adelante

<400> 14

acaccacctg aacgtctctt c 21

<210> 15

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> iniciador_enlace

<222> (1)...(21)

10 <223> Iniciador de amplificación para LTA humano - inverso

<400> 15

tctcaatccc tgaggaagtg g 21

<210> 16

<211> 24

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> iniciador_enlace

<222> (1)...(24)

20 <223> iniciador de secuenciación para LTA humano - hacia adelante

<400> 16

tcagccaaac cttgagcct agag 24

<210> 17

<211> 34

25 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> iniciador_enlace

<222> (1)...(34)

30 <223> iniciador de secuenciación para LTA humano - inverso

<400> 17

atgtttacca atgaggtgag cagcaggttt gcgg 34

<210> 18

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> iniciador_enlace

<222> (1)...(20)

10 <223> Iniciador de amplificación para TNF humano - hacia adelante

<400> 18

tgggagtgag aactcccag 20

<210> 19

<211> 20

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> iniciador_enlace

<222> (1)...(20)

20 <223> Iniciador de amplificación para TNF humano - inverso

<400> 19

tgagctcatc tggaggaagc 20

<210> 20

<211> 20

25 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> iniciador_enlace

<222> (1)...(20)

30 <223> Iniciador de secuenciación para TNF humano - hacia adelante

<400> 20

tgggagtgag aacttcccag 20

<210> 21

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> iniciador_enlace

<222> (1)...(20)

10 <223> iniciador de secuenciación para TNF humano - inverso

<400> 21

cttaaacgtc ccctgtattc 20

<210> 22

<211> 894

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> variación

<222> (9)...(743)

20 <223> Región de codificación del polimorfismo LTB*1 (G)

<400> 22

cagtctcaat	gggggcactg	gggctggagg	gcaggggtgg	gaggctccag	gggagggggtt	60
ccctcctgct	agctgtggca	ggagccactt	ctctggtgac	cttggtgctg	gcggtgccta	120
tactgtcct	ggctgtgctg	gccttagtgc	cccaggatca	gggaggactg	gtaacggaga	180
cggccgaccc	cggggcacag	gcccagcaag	gactgggggtt	tcagaagctg	ccagaggagg	240
agccagaaac	agatctcagc	cccgggctcc	cagctgcca	cctcataggc	gctccgctga	300
aggggcaggg	gctaggctgg	gagacgacga	aggaacaggg	gtttctgacg	agcgggacgc	360
agttctcga	cgccgagggg	ctggcgctcc	cgcaggacgg	cctctattac	ctctactgtc	420
tcgtcggcta	ccggggccgg	gcgccccctg	gcggcgggga	ccccagggc	cgctcggta	480
cgctgcgcag	ctctctgtac	cgggcggggg	gcgccctacgg	gcccgggact	cccagactgc	540
tgctcgaggg	cgccgagacg	gtgactccag	tgctggacc	ggccaggaga	caagggtagc	600
ggcctctctg	gtacacgagc	gtggggttcg	gcggcctggt	gcagctccgg	aggggagaga	660
gggtgtacgt	caacatcagt	caccccgata	tggtggactt	cgcgagaggg	aagaccttct	720
ttggggccgt	gatggtgggg	tgaggggaata	tgagtgcgtg	gtgcgagtgc	gtgaatattg	780
ggggcccga	cgcccaggac	cccatggcag	tgggaaaaat	gtaggagact	gtttggaaat	840
tgattttgaa	cctgatgaaa	ataaagaatg	gaaagcttca	gtgctgcca	taaa	894

REIVINDICACIONES

1. Uso de pimecrolimus en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de dermatitis atópica pediátrica en una población seleccionada de pacientes, en donde la población de pacientes se selecciona de entre aquellos que tienen ya sea

- 5 (i) un genotipo TT en un locus localizado -1031 del sitio de inicio de la transcripción del gen *TNF* humano, o
(ii) un genotipo AA o AC en el locus ASN60THR *LTA* del gen *LTA* humano.

2. Uso de tacrolimus en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de dermatitis atópica pediátrica en una población seleccionada de pacientes, en donde la población de pacientes se selecciona de entre aquellos que tienen al genotipo AG en el locus de VAL64ILE *CCR2* del gen *CCR2* humano.

10

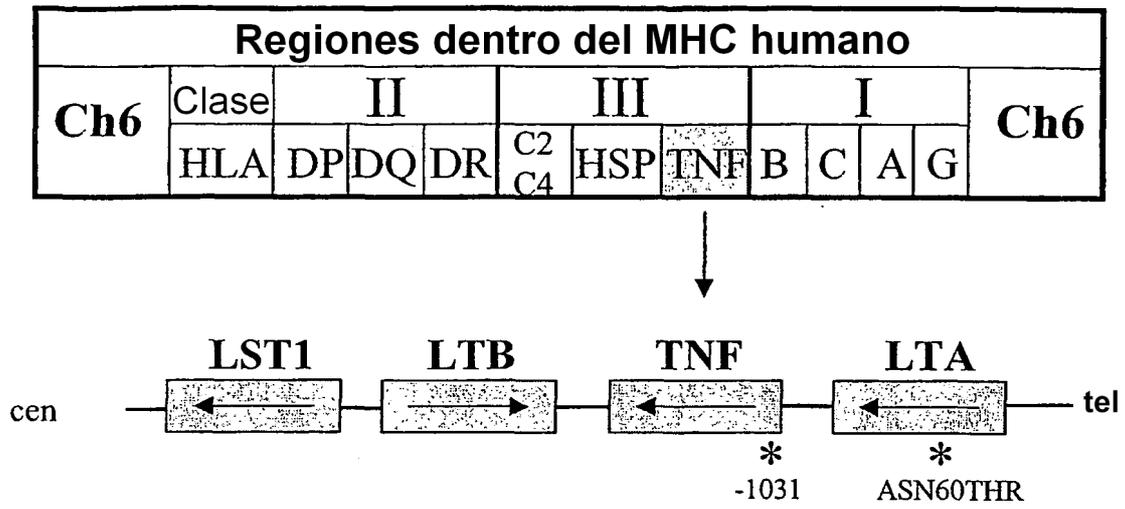


FIG. 1

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

5 Documentos de patente citados en la descripción

- EP 730663 A [0026]
- EP 717113 A [0026]
- US 9702102 W [0026]
- US 6566501 B [0027]
- US 6541620 B [0027]
- US 6537540 B [0027]
- US 5912238 A [0030]
- US 6352998 B [0030]
- US 6423722 B [0030]
- US 6300076 B [0042]
- US 6297018 B1 [0042]
- US 6300063 B1 [0042]
- US 5846717 A [0043]
- US 6001567 A [0043]
- WO 9820020 A [0045]
- WO 9820019 A [0045]
- US 4965188 A [0056]
- WO 9001069 A [0056]
- US 5130238 A [0057]
- EP 329822 A [0057]
- US 5169766 A [0057]
- WO 8906700 A [0057]
- WO 9511995 A [0060]
- WO 9215712 A [0062]
- US 5679524 A [0062]
- WO 9102087 A [0062]
- WO 9009455 A [0062]
- WO 9517676 A [0062]
- US 5302509 A [0062]
- US 5945283 A [0062]
- US 5605798 A [0062]
- WO 9322456 A [0062]
- WO 8910414 A [0062]
- US 5866404 A [0063] [0064]
- US 5610053 A [0098]
- US 4843155 A [0121]
- US 4683202 A, Mullis [0124]
- US 5854033 A [0124]
- US 60508971 B [0174]

Literatura citada en la descripción que no es de patente:

- Cookson W. O. et al. *Nature Genetics*, 2001, vol. 27, 372 - 373 [0002] [0004] [0022] [0034]
- Maclean J. A. ; Eidelman F. J. *Arch Dermatol*, 2001, vol. 137, 1474 - 1476 [0004]

10 • Field M. Q *J Med*, 2001, vol. 94, 237 - 246 [0019] [0022]

- Rulls S. R. ; Sedgwick J. D. *Am J Hum Genet*, 1999, vol. 65, 294 - 301 [0022]

- Trabetti E et al. *J Med Genet*, 1999, vol. 36, 323 - 5 [0022]
- Izakovicova Holla L et al. *Clin Exp Allergy*, 2001, vol. 9, 1418 - 23 [0022]
- Castro J et al. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2000, vol. 3, 149 - 5 [0022]
- Li Kam ; Wa T. C. et al. *Clin Exp Allergy*, 1999, vol. 29, 1204 - 8 [0022]
- 5 • Zhu S et al. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, vol. 161, 1655 - 9 [0022]
- LaDuca J. R. ; Gaspari A. A. *Dermatol Clin*, 2001, vol. 19, 617 - 635 [0022]
- Mease P. J. *Ann Rheum Dis*, 2002, vol. 61, 298 - 304 [0022]
- PCR Technology: Principles and Applications for ADN Amplification. Freeman Press, 1992 [0026]
- PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, 1990 [0026]
- 10 • Kan ; Dozy. *Lancet*, 1978, vol. II, 910 - 912 [0026]
- Wallace et al. *Nucl. Acids Res.*, 1978, vol. 6, 3543 - 3557 [0026]
- Saiki et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1969, vol. 86, 6230 - 6234 [0026]
- Maskos ; Southern. *Nucl. Acids Res.*, 1993, vol. 21, 2269 - 2270 [0026]
- Newton et al. *Nucl. Acids Res.*, 1989, vol. 17, 2503 - 2516 [0026]
- 15 • Faham ; Cox. *Genome Res.*, 1995, vol. 5, 474 - 482 [0026]
- Wagner et al. *Nucl. Acids Res.*, 1995, vol. 23, 3944 - 3948 [0026]
- Fisher ; Lerman. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1983, vol. 80, 1579 - 1583 [0026]
- Orita et al. *Genomics*, 1983, vol. 5, 874 - 879 [0026]
- Myers et al. *Science*, 1985, vol. 230, 1242 [0026]
- 20 • Cotton et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, vol. 8Z, 4397 - 4401 [0026]
- Youil et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1995, vol. 92, 87 - 91 [0026]
- Syvanen et al. *Genomics*, 1990, vol. 8, 684 - 692 [0026]
- Nikiforov et al. *Nucl. Acids Res.*, 1994, vol. 22, 4167 - 4175 [0026]
- Landegren et al. *Science*, 1988, vol. 241, 1077 [0026]
- 25 • Barrany. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1991, vol. 88, 189 - 193 [0026]
- Abravaya et al. *Nucl. Acids Res.*, 1995, vol. 23, 675 - 682 [0026]
- Orum et al. *Nucl. Acids Res.*, 1993, vol. 21, 5332 - 5356 [0026]
- Thiede et al. *Nucl. Acids Res.*, 1996, vol. 24, 983 - 984 [0026]
- Sambrook J et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, 2000 [0026]
- 30 • Actor J. K. et al. *Comb Chem High Throughput Screen*, August 2000, vol. 3 (4), 343 - 51 [0028]

- Anderson G. D. et al. *J Clin Invest.*, 01 June 1996, vol. 97 (11), 2672 - 9 [0028]
- Van Deventer S. J. H. *Gut*, 1997, vol. 40, 443 - 8 [0028]
- McAlindon M. E. ; Mahida Y. R. *Aliment Pharmacol Ther*, 1996, vol. 10 (2), 72 - 4 [0028]
- Reimund J-M et al. *J Clin Immunol*, 1996, vol. 16, 144 - 50 [0028]
- 5 • Reinecker H-C et al. *Clin Exp Immunol*, 1993, vol. 94, 174 - 81 [0028]
- Murch S. H. et al. *Gut*, 1993, vol. 34, 1705 - 9 [0028]
- Grom A. A. et al. *Arthritis Rheum*, 1996, vol. 39, 1703 - 1710 [0028]
- Nghiem P et al. *J Am Acad Dermatol*, 2002, vol. 46, 228 - 241 [0030] [0031] [0033] [0034]
- Marsland A. M. ; Griffiths C. E. *Eur J Dermatol.*, November 2002, vol. 2 (6), 618 - 22 [0033]
- 10 • Wang et al. *Science*, 1998, vol. 280, 1077 - 1082 [0035]
- Nowotny P. *Current Opinions in Neurobiology*, 2001, vol. 11, 637 - 641 [0038]
- Shi M. M. *Clin Chem*, 2001, vol. 47, 164 - 172 [0041] [0042]
- Cox et al. *Hum Mutat*, 2001, vol. 17, 141 - 150 [0041]
- Chan X et al. *Genome Res*, 1999, vol. 9, 492 - 499 [0042]
- 15 • Ahmadiian A et al. *Anal Biochem*, 2000, vol. 280, 103 - 10 [0042]
- Ryan D et al. *Molecular Diagnosis*, 1999, vol. 4 (2), 135 - 144 [0043]
- Lyamichev V et al. *Nature Biotechnology*, 1999, vol. 17, 292 - 296 [0043]
- Stevens J. C. *Mol Diag*, 1999, vol. 4, 309 - 317 [0055]
- Barany et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, vol. 88, 189 - 193 [0056]
- 20 • Landegren et al. *Science*, 1988, vol. 241, 1077 - 1080 [0056]
- Walker et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, vol. 89, 392 - 396 [0057]
- Winter et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, vol. 82, 7575 [0061]
- Meyers et al. *Science*, 1985, vol. 230, 1242 [0061]
- Modrich P. *Ann Rev Genet*, 1991, vol. 25, 229 - 253 [0061]
- 25 • Orita et al. *Genomics*, 1989, vol. 5, 874 - 879 [0061]
- Humphries et al. *Molecular Diagnosis of Genetic Diseases*. 1996, 321 - 340 [0061]
- Wartell et al. *Nucl Acids Res*, 1990, vol. 18, 2699 - 2706 [0061]
- Sheffield et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, vol. 86, 232 - 236 [0061]
- Ruafio et al. *Nucl Acids Res*, 1989, vol. 17, 8392 [0062]
- 30 • Ruafio et al. *Nucl Acids Res*, 1991, vol. 19, 6877 - 6882 [0062]

- Turki et al. *J Clin Invest*, 1995, vol. 95, 1635 - 1641 [0062]
- D. L. Hartl et al. *Principles of Population Genomics*. Sinauer Associates, 1997 [0063]
- Michalotos-Beloin et al. *Nucl Acids Res*, 1996, vol. 24, 4841 - 4843 [0063] [0064]
- *Statistical Methods in Biology*. Cambridge Univ. Press, 1997 [0068]
- 5 • Waterman M. S. *Introduction to Computational Biology*. CRC Press, 2000 [0068]
- *Bioinformatics*. John Wiley & Sons, Inc, 2001 [0068]
- L. D. Fisher ; G. vanBelle. *Biostatistics: A Methodology for the Health Sciences*. Wiley-Interscience, 1993 [0078]
- *Genetic Algorithms and Their Uses in Chemistry*. R. Judson. *Reviews in Computational Chemistry*. VCH Publishers, 1997, vol. 10, 1 - 73 [0079]
- 10 • Press et al. *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press, 1992 [0079]
- E. Rich ; K. Knight. *Artificial Intelligence*. Mc-Graw-Hill, 1991 [0079]
- *The Introduction of Foreign Genes into Mice. Recombinant ADN*. W.H. Freeman and Company, 254 - 272 [0099]
- *Current Protocols in Molecular Biology*. 1997, vol. I - III [0100]
- Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0100]
- 15 • *ADN Cloning: A Practical Approach*. 1985, vol. I, II [0100]
- *Oligonucleotide Synthesis*. 1984 [0100]
- *Nucleic Acid Hybridization*. 1985 [0100]
- *Transcription and Translation*. 1984 [0100]
- *Animal Cell Culture*. 1986 [0100]
- 20 • *Immobilized Cells and Enzymes*. IRL Press, 1986 [0100]
- Perbal. *A Practical Guide to Molecular Cloning* [0100]
- *Methods in Enzymol*. Academic Press, Inc, 1984 [0100]
- *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1987 [0100]
- *Methods in Enzymology*. vol. 154, 155 [0100]
- 25 • Tom Strachan ; Andrew, Read. *Human Molecular Genetics*. John Wiley and Sons, Inc, 1999 [0104]
- *Curr. Prot. Mol. Biol*. John Wiley & Sons, 1987 [0121]
- Guatelli et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 1874 - 1878 [0124]
- Kwoh et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 1173 - 1177 [0124]
- Lizardi et al. *Biol. Technology*, 1988, vol. 6, 1197 [0124]
- 30 • Lyamichev V et al. *Nat Biotechnol*, 1999, vol. 17, 292 - 6 [0142]
- Ryan D. *Mol Diagn*, 1999, vol. 4, 135 - 44 [0142]

- Bouma G et al. *Scand J Immunol*, 1996, vol. 43, 456 - 63 [0156]
- Noguchi E et al. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, vol. 166, 43 - 6 [0156]
- Moffatt M ; Cookson W. *Hum Molec Genet*, 1997, vol. 6, 551 - 4 [0156]
- Messer G et al. *J Exp Med*, 1991, vol. 173, 209 - 19 [0156]
- 5 • Boring L et al. *Nature*, 1998, vol. 394, 894 - 7 [0168]
- Mummidi S et al. *Nature Med*, 1998, vol. 4, 786 - 93 [0168]
- Nghiem P et al. *J Am Acad Dermatol*, 2002, vol. 46, 228 - 241 [0173]