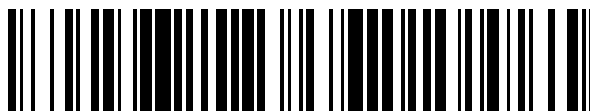


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 709**

51 Int. Cl.:
C12P 19/34 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07849174 .3**
96 Fecha de presentación: **19.11.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2121955**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.11.2009**

54 Título: **Método del uso de una proteína de epirregulina y un ácido nucleico codificando la misma en condiciones inflamatorias**

30 Prioridad:
20.11.2006 US 860139 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.04.2012

73 Titular/es:
**PIRAMAL LIFE SCIENCES LIMITED
PIRAMAL TOWER GANPATRAO KADAM MARG.
LOWER PAREL
MUMBAI 400 013 MAH, IN**

72 Inventor/es:
**PADIGARU, Muralidhara;
SHARMA, Somesh;
THAKKAR, Arvind;
RATHINA SABAPATHY, Anandharajan;
PARIKH, Sapna Hasit y
GHOSH, Usha**

74 Agente/Representante:
Izquierdo Faces, José

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).

ES 2 378 709 T3

DESCRIPCIÓN

Método de el uso de una proteína de epirregulina y un ácido nucleico codificando la misma en condiciones inflamatorias

5

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a unas secuencias de nucleótido y proteína de epirregulina y métodos de emplearlas como un marcador de respuesta a fármacos en condiciones inflamatorias. La invención también proporciona una proteína de epirregulina para el uso en el tratamiento de artritis reumatoide o artritis reumatoide juvenil.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La epirregulina es un miembro de la familia de factores de crecimiento epidérmicos (EGF) de los factores de crecimiento, que incluye, entre otros, el EGF, el factor de crecimiento transformante alfa (TGF), la anfiregulina, la heparina que enlaza con el EGF, la betacelulina, y las varias heregulinas. Fue primero identificada en el medio condicionado por la célula NIH 3T3 y es uno de los siete ligandos conocidos para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Ver Yarden y otros, Nat. REv. Mol. Cell Biol., 2001, 2:127-137). La secuencia de codificación del ADNc de la epirregulina humano predice un polipéptido de cadena única de 46 aminoácidos, exhibiendo un 24-50% de homología con las secuencias de otros ligandos EGFR.

15

20

25

30

[0003] La epirregulina es sintetizada como un precursor de la transmembrana antes de ser escindida proteolíticamente para liberar una proteína activa de 46 aminoácidos. El modo de acción de la epirregulina es similar al de otros miembros de la familia de EGF en que enlaza y activa la tirosina-quinasa, los receptores de la familia ErbB (ErbB1 a B4). A diferencia de otros ligandos de la EGFR, la epirregulina muestra una actividad biológica dual; estimula la proliferación de fibroblastos, hepatocitos, células del músculo liso, y queratinocitos pero inhibe el crecimiento de varias líneas celulares epiteliales derivadas de tumores (Ver Toyoda y otros, Biochem. J., 1997, 326:69-75). La epirregulina también muestra más bioactividad potente in vitro que otros factores de crecimiento similares del EGF. Los miembros de la familia EGF, incluyendo la epirregulina, juegan un papel fundamental en los tejidos epiteliales y los queratinocitos humanos de una forma autocrina; sin embargo, sus papeles en las respuestas inmunes y el papel fisiológico de la epirregulina aun no se ha dilucidado.

35

40

[0004] La epirregulina es uno de los ligandos para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La súper familia de los EGF y la familia de los EGFR, incluyendo el EGFR (ErbB1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3), y ErbB4 (HER4) (Ver Riese & Stern, BioEssays 1998, 20: 41-48), juegan un papel fundamental en los tejidos epiteliales. Los miembros de la familia de EGF, incluyendo el EGF, el factor de crecimiento transformante α , la anfiregulina, la heparina que enlaza con el EGF (HB-EGF), la epirregulina, y otros miembros, regulan estos receptores induciendo el homo- y hetero- oligomerización. (Ver Yarden & Sliwkowski, Nat. REv. Mol. Cell biol., 2001, 2:127-137). Los miembros de la familia del EGF varían en su capacidad para activar distintos heterodímeros ErbB, y este mecanismo puede, en parte, explicar las diferencias en sus bioactividades (Ver Jackson y otros, EMBO J., 2003, 22:2704-2716).

45

50

[0005] El precursor anclado a la membrana de la familia de los EGF está enzimáticamente procesado externamente para liberar una forma soluble madura que actúa como factor de crecimiento autocrino y/o paracrino, mientras que algunos miembros de la familia de los EGF actúan en la forma anclada a la membrana. Se sugirió que un precursor de la membrana bioactivo, pro-HB-EGF, induce la inhibición o la apoptosis del crecimiento en lugar de la respuesta proliferativa inducida por el HB-EGF soluble. La epirregulina actúa como un factor de crecimiento autocrino en los queratinocitos humanos normales in vitro, la diferenciación de las células del musculo liso vascular y como uno de los mediadores paracrinos que propagan las señales de hormonas luteinizantes en el folículo ovárico; sin embargo, su papel fisiológico in vivo todavía no es conocido.

55

[0006] Tanto la forma enlazada a la membrana con ola secretada de la epirregulina están identificas, Sirawasa y otros (Ver PNAS, 2004, 101:13921) han informado que la deficiencia de epirregulina causa dermatitis crónica en ratones.

[0007] La respuesta inflamatoria representa la respuesta del cuerpo a una lesión que puede surgir de una variedad de agentes como organismos infecciosos, toxinas incluyendo el alcohol, alergias, respuestas autoinmunes, traumas, laceraciones, quemaduras, oclusiones circulatorias y otros factores que incluyan daños en el tejido. Actualmente, la proteína C-reactiva se usa extensivamente como marcador del estado inflamatorio. Sin embargo, es un marcador no específico que no puede diagnosticar una enfermedad particular pero se usa para ganar comprensión de las condiciones de la inflamación. Se necesitan marcadores más sensibles ya sean marcadores individuales o usados en combinación con la proteína C-reactiva para un valor pronóstico mayor (Philips y otros, J. of Endocrinology, 1999; 161,195-198).

60

65

[0008] El curado de heridas es el proceso de reparar que sigue a la lesión a la piel y otros tejidos lisos. El proceso de curar heridas implica dos componentes esenciales – regeneración y reparación. En la regeneración, un tejido especializado es reemplazado por la proliferación de células especializadas no dañadas circundantes. En la reparación, el tejido perdido es reemplazado por tejido de granulación para formar tejido de cicatrización.

[0009] La psoriasis (PS) es una enfermedad de la piel común caracterizada por la inflamación de la piel y la hiperproliferación de los queratinocitos epidérmicos que puede ser provocada tanto por factores de riesgo genéticos como medioambientales. Afecta aproximadamente a un 2% de individuos de la población del norte de Europa. Las tres características cardinales de las lesiones psoriásicas son eritema, endurecimiento y escamación. Se ve una asociación en la artritis psoriásica en un 6-10% de los casos. En los pacientes jóvenes es frecuentemente provocada por la infección con el estreptococo del grupo A, y puede también aparecer con la infección del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (ver Duvic y otros, J. Invest. Dermatol. 1990, 95:38S-40S). La patogénesis de la psoriasis todavía no es conocida.

[0010] La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad sistémica con manifestaciones clínicas altamente variables. La artritis reumatoide generalmente afecta a las articulaciones de las extremidades e implica las articulaciones sinoviales entre dos huesos. Es una enfermedad inflamatoria crónica que pasa a través de varias etapas y finalmente resulta en una destrucción masiva de las articulaciones o inflamaciones en el área del tendón. DE acuerdo al estado reciente del conocimiento, se considera que las células T inician y mantienen la inflamación. En este proceso, las citocinas así como las células mesenquimales (macrófagos y fibroblastos sinoviales) están activas. Es muy probable que la TNF- α citocina sea uno de los mediadores de la inflamación. Promueve la formación del pannus, que es típico de la RA, y promueve la destrucción del cartílago. La TNF- α aumenta el número de moléculas de adhesión para los leucocitos en la superficie de las células endoteliales y la penetración de la capa endotelial capilar. Esto resulta en una afluencia masiva de leucocitos en la sinovia. La citocina promueve la secreción de metaloproteinasas de la matriz por los sinoviocitos. Estos enzimas están directamente implicados en la destrucción de los huesos y el cartílago. La TNF- α también sintetiza receptores de dolor, lo que está asociado con la inducción de sensaciones de dolor. La TNF- α juega un papel crítico en la iniciación y el mantenimiento de la RA.

[0011] Los cambios en la expresión del gen y/o proteína se han descrito anteriormente en la psoriasis y otras enfermedades inflamatorias. La IL-1 y la TNF- α están reguladas por aumento la psoriasis y activan varias vías de señalización celular incluyendo la vía NF- κ B. Se ha informado de la expresión del gen diferencial de mucho transcritos en la piel psoriásica en comparación con la piel normal (Ver Bowcock y otros, Human Molecular Genetics, 2001, 10:1793). La modificación puede ser por regulación por aumento (por ejemplo: IL-8R) o por regulación por disminución (por ejemplo proteína 1 rica en cisteína).

[0012] Draper Bradley K. y otros "la epirregulina mejora la reparación de las heridas por escisión del murino", Wound Repair and Regeneration: Publicación Oficial de la Wound Healing Society [y] la European Tissue Repair Society, 2003 Mayo-Junio, volume 11, N° 3, Mayo 2003 (2003-05), páginas 188-197, revela que la epirregulina tópica mejora la reparación de las heridas por escisión del murino, en particular la proliferación y engrosamiento epidérmico y dérmico.

[0013] Paniccia Christina y otros, "La epirregulina mejora la severidad de la colitis con predisposición al cáncer en el modelo de ratón IL10", Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting, vol. 46, Abril 2005 (2005-04), página 462, XP001525106, revela que un modelo químico de sulfato de sodio de dextrano de la colitis en ratones deficientes en interleucina-10 muestra la epirregulina requerida para la homeostasis y la protección intestinal normal de la colitis inducida químicamente, mientras que el doble de los ratones mutantes deficientes para la epirregulina y la interleucina-10 muestran severidad reducida del daño intestinal relacionado con la inflamación.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0014] La presente invención se refiere a las secuencias de nucleótidos y proteínas de la epirregulina y su uso como un marcador de respuesta al fármaco en condiciones inflamatorias. Además la invención se refiere a la proteína de la epirregulina para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide o la artritis reumatoide juvenil.

[0015] En un aspecto la invención proporciona un método para predecir la respuesta de un paciente a un fármaco empleado en el tratamiento de una condición inflamatoria en el paciente, el método comprende: determinar el nivel de la expresión del gen de epirregulina en la muestra de sangre del paciente; y predecir la respuesta del paciente al fármaco empleado en el tratamiento de la condición inflamatoria.

[0016] En otro aspecto, la invención proporciona un método para monitorizar la respuesta al fármaco en un paciente que recibe tratamiento para una condición inflamatoria, el método comprende: determinar el nivel de proteína de epirregulina en la muestra de suero del paciente; y monitorizar la respuesta al fármaco en el paciente que recibe tratamiento para una condición inflamatoria.

[0017] En todavía otro aspecto, la invención proporciona un método para determinar la probabilidad de que un sujeto desarrolle una condición inflamatoria, el método comprendiendo: determinar el nivel de la expresión del gen de epirregulina en la muestra de sangre del sujeto.

5 [0018] En otro aspecto la invención proporciona un método para monitorizar la respuesta al fármaco en un paciente que recibe tratamiento para una condición inflamatoria con un compuesto antiinflamatorio, el método comprende: medir la expresión del gen de epirregulina en la muestra de sangre o suero del paciente para niveles elevados de la expresión del gen de epirregulina; y monitorizar la respuesta al fármaco en el paciente que recibe el
10 tratamiento para la condición inflamatoria con un compuesto antiinflamatorio.

[0019] Otro aspecto de la invención proporciona una proteína de epirregulina, sola o en combinación con al menos otro compuesto antiinflamatorio, para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide o la artritis reumatoide juvenil.

15 **DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION**

[0020] Se describe un método para detectar un aumento en la expresión del gen de epirregulina tras la administración de un agente antiinflamatorio. También se describe el uso de la epirregulina como un marcador de respuesta al fármaco para las condiciones inflamatorias, y el uso de los niveles de la proteína de epirregulina para diagnosticar una condición inflamatoria en un sujeto. Se describe en la presente que el factor de crecimiento similar al mitógeno de epirregulina reacciona con la EGFR y está implicado en la proliferación celular epitelial y otros procesos biológicos. Además, los estudios del inventor muestran que la epirregulina secretada es regulada por aumento selectivamente en respuesta a un agente antiinflamatorio, lo que indica claramente su uso como un marcador de respuesta al fármaco. Además, la epirregulina regula la curación de la herida por regulación por disminución de los procesos inflamatorios y la proliferación celular epitelial en los queratinocitos, lo que es indicativo de su potencial terapéutico para las condiciones inflamatorias como la psoriasis.

[0021] La longitud del polinucleótido de la epirregulina es de 506 bp, el N° de entrada es el NM_001432, y la longitud de la secuencia de la proteína es de 169 aminoácidos. El gen de la epirregulina de la presente invención tiene una secuencia de ADN, codificada por polinucleótidos como se muestra en la Tabla 1 y la secuencia de proteína en la Tabla 2.

Tabla 1 Nucleotido de Epirregulina (SEQ ID NO:1)

```

AgccccagcgcccgcctcccatcqqccqATGACCGCGGGGAGGAGGATGGAGATGCTCTGTGCCGG
CAGGGTCCCTGCGCTGCTGCTCTGCCTGGGTTTCCATCTTCTACAGGCAGTCCTCAGTACAACT
GTGATTCCATCATGTATCCCAGGAGAGTCCAGTGATAACTGCACAGCTTTAGTTCAGACAGAAG
ACAATCCACGTGTGGCTCAAGTGTCAATAACAAAGTGTAGCTCTGACATGAATGGCTATTGTTT
GCATGGACAGTGCATCTATCTGGTGGACATGAGTCAAACTACTGCAGGTGTGAAGTGGGTTAT
ACTGGTGTCCGATGTGAACACTTCTTTTTTAACCGTCCACCAACCTTTAAGCAAAGAGTATGTGG
CTTTGACCGTGATTCTTATTATTTTGTCTTATCACAGTCGTCGGTTCCACATATTATTTCTG
CAGATGGTACAGAAATCGAAAAAGTAAAGAACCAAGAAGGAATATGAGAGAGTTACCTCAGGG
GATCCAGAGTTGCCGCAAGTCTTGAatggcgccatcaaacttatgggca
    
```

Tabla 2 Proteína de Epirregulina (SEQ ID: NO 2)

Secuencia de la Proteína de Epirregulina Humana (NP_001423, HUMAN_EREG) 169 aminoácidos
 MTAGRRMEMLCAGRVPALLLCLGLFHLLOAVLSTTVIPSCIPGESSDNCTALVQTEDNPRVAQVS
 ITKCSSDMNGYCLHGQCIYLVDMSONYCRCEVGYTGVRCEHFFLTVHQPLSKSEYVALTVILLIIL
 FLITVVGSTYYFCRWYRNRKSKPEPKKEYERVVTSVGDPELFPQV

5 [0022] Los estudios del inventor emplearon un método de aislar primero el ARN de los leucocitos de la sangre periférica humana normal tratados con fármacos antiinflamatorios (como los revelados en la solicitud de patente de PCT publicada WO2006051477) y con Rolipram. (El Rolipram es usado como un fármaco de control positivo para identificar agentes terapéuticos potenciales para el tratamiento de desordenes inflamatorios crónicos como la artritis reumatoide). Los leucocitos aislados fueron activados con lipopolisacáridos bacterianos. La calidad y cantidad del ARN fue medida por espectrometría y electroforesis en gel. El perfil de la expresión del gen fue realizado por el proceso de micromatriz como es conocido en la técnica.

5 **[0023]** La expresión aumentada de la epirregulina en respuesta al compuesto antiinflamatorio indica que los polinucleótidos y los polipéptidos de la presente invención son útiles como marcadores de respuesta a fármacos. EL marcador puede ser empleado para la identificación diferencial de los respondedores contra los no respondedores para el tratamiento de, por ejemplo, la inflamación o los desordenes inflamatorios. La epirregulina, que es una proteína secretada, puede ser detectada en la muestra de sangre del sujeto en cantidades medibles. Niveles elevados de epirregulina en la muestra son indicativos de una respuesta positiva a los compuestos antiinflamatorios.

10 **[0024]** Los polinucleótidos y polipéptidos de la invención son también útiles como marcadores diagnósticos para la identificación de la condición de enfermedad en una muestra biológica dada en condiciones que incluyen, pero no están limitadas a, inflamación y desordenes inflamatorios. La epirregulina puede ser detectada en la muestra de sangre o suero del sujeto en cantidades medibles. Niveles de epirregulina modificados en la muestra del sujeto son indicativos de susceptibilidad a la inflamación o desordenes inflamatorios.

15 **[0025]** La presente invención incluye la proteína de epirregulina, sola o en combinación con al menos un compuesto antiinflamatorio, para el uso en el tratamiento de artritis reumatoide o artritis reumatoide juvenil. Los compuestos antiinflamatorios conocidos como la ciclofosfamida y la azatioprina, la dexametasona y la hidrocortisona, pueden ser usados en combinación con la proteína de epirregulina. Los dos compuestos, la epirregulina y el agente antiinflamatorio, pueden ser administrados una vez o dos veces al día como se requiera. Los compuestos pueden ser administrados simultáneamente o secuencialmente. La epirregulina puede ser formulada con un compuesto antiinflamatorio y administrada al paciente que necesita el tratamiento para la condición inflamatoria. Se cree que el administrar la epirregulina como un tratamiento para la psoriasis se puede basar en la proliferación celular epitelial inducida por la epirregulina y la regulación por disminución de los procesos inflamatorios en la piel. Estas dos características promueven la curación de heridas.

25 **[0026]** Por el uso de los métodos de la invención, alguien con conocimientos de la técnica genómica puede identificar múltiples grupos de genes relacionados, muchos representando procesos con relaciones previamente no reconocidas a las condiciones inflamatorias o inmunológicamente relacionadas. Las composiciones de los conjuntos que comprende la materia, polinucleótidos, polipéptidos codificados en los mencionados polinucleótidos, pueden ser identificadas como estando involucradas en el tratamiento de enfermedades de la piel, cáncer y condiciones inflamatorias, en particular, el conjunto de genes se puede usar para el tratamiento de condiciones inflamatorias como la psoriasis y la artritis.

Definiciones

35 **[0027]** El biomarcador es un concepto bien conocido y útil en la técnica genómica y biofarmacéutica. El "biomarcador" como se hace referencia en la presente, es una manifestación biológica medible que es una indicación cuantitativa de la presencia y grado de un proceso biológico subyacente de interés, por ejemplo, respuesta del fármaco al diagnóstico.

40 **[0028]** Como se usa en la presente, un "polinucleótido" se refiere a una molécula que tienen una secuencia de ácido nucleico contenida en la SEQ ID NO:1. Por ejemplo, el polinucleótido puede contener la secuencia de nucleótido de la secuencia del ADNc de longitud total, incluyendo las secuencias no traducidas 5' y 3', la región codificante, con o sin la secuencia de señal, la región que codifica la secuencia, así como fragmentos, epítomos, dominios, y variantes de la secuencia de ácido nucleico.

45 **[0029]** Además, como se usa en la presente, un "polipéptido" se refiere a una molécula que tiene la secuencia de aminoácido traducida generada del polinucleótido como se define en general. El polipéptido usado en la presente invención está ejemplificado por la SEQ ID NO:2.

50 **[0030]** Como se usa en la presente, una proteína "secretada" se refiere a aquellas proteínas capaces de ser dirigidas al retículo endoplásmico, las vesículas secretoras, o al espacio extracelular como resultado de una secuencia de señal, así como a aquellas proteínas liberadas en el espacio extracelular sin contener necesariamente la secuencia de señal. Si la proteína secretada es liberada en el espacio extracelular, la proteína secretada puede experimentar un proceso extracelular para producir una proteína "madura. La liberación en el espacio extracelular puede tener lugar por muchos mecanismos, incluyendo la exocitosis y la escisión proteolítica.

55 **[0031]** Un polipéptido que tiene actividad "biológica" se refiere a polipéptidos que muestran actividad similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad de un polipéptido de la presente invención, incluyendo las formas maduras, como se mide en un ensayo biológico particular, con o sin dependencia de la dosis. En el caso donde existe dependencia de la dosis, no necesita ser idéntica a la del polipéptido, si no sustancialmente similar a la dependencia de la dosis en una actividad dada en comparación con el polipéptido de la presente invención, por ejemplo, el polipéptido candidato puede mostrar mayor actividad o no más que alrededor de 25 veces menos y, preferiblemente, no más que diez veces menos de actividad, y más preferiblemente, no más que alrededor de tres veces menos actividad en relación con el polipéptido de la presente invención.

60 **[0032]** La invención está adicionalmente ilustrada en los siguientes ejemplos no limitativos

Ejemplos:

5 [0033] El compuesto P979 fue sintetizado de acuerdo a los procesos descritos en la solicitud de patente PCT publicada WO2006051477. EL P979 es un compuesto antiinflamatorio que se ha demostrado que tiene un IC₅₀ menor de 1µM como se ah informado en el Ejemplo 43, Tabal 2 de la solicitud de PCT WO2006051477.

Ejemplo 1: Expresión de epirregulina en monocitos de la sangre periférica (PBMNCs) tras la exposición a un agente antiinflamatorio y su estudio por micromatriz en base al perfil de expresión

10

Método:

15 [0034] Exposición de los PBMNCs al P979 y al Rolipram: Se obtuvieron leucocitos de sangre periférica humana de donantes de sangre normales por separación por gradiente de densidad, se lavaron (salino regulado con fosfato), y se colocaron en placas de petri usando el medio RPMI. Las células fueron tratadas durante 30 minutos con compuestos de prueba a concentraciones de 0,3, 1,0 y 3,0 µM y con Rolipram a 300 µM como un control como se muestra en la sección de resultados y posteriormente activadas con lipopolisacárido bacteriano (LPS). Tras 2 horas, las células fueron recogidas y se preparó el ARN.

20 [0035] Preparación del ARN: El ARN fue preparado añadiendo 1 ml del reactivo trizol (sigma) posteriormente purificado usando el kit Qiagen-RNAEasy, usando las instrucciones del protocolo del fabricante. La calidad y la cantidad de ARN fueron medidas por espectrometría y electroforesis en gel.

25 [0036] Perfil de la expresión del gen por micromatriz: Se usó un total de 10 µg de ARN para generar ARNc, que es posteriormente etiquetado con colorantes fluorescentes Cy3 y Cy5. Los ARNcs de control y prueba etiquetados con Cy3 y Cy5 respectivamente fueron combinados e hibridizados en un chip de ADN. Los chips de ADN fueron sintetizados en la casa y contienen 23, 290 oligómeros (oligonucleótidos 70-mer, obtenidos de Illumina, U.S.A.) que representan la lista de genes de referencia bien anotada del genoma humano. Se uso el kit de micromatriz Pronto plus de Promega durante el procedimiento de micromatriz de acuerdo al protocolo del fabricante. Los chips de ADN hibridizado fueron escaneados y se generaron las imágenes. Tras el análisis de imagen, la intensidad de imagen para cada uno de los puntos 23, 290 se midió para los portaobjetos de prueba y control.

30

Resultados:

35 [0037] La expresión del gen fue expresada como una proporción de la intensidad de imagen entre los portaobjetos de prueba y control para un gen dado (Tabla 3). La proporción de la intensidad entre una normal del portaobjetos y la de prueba fue considerada como normal, mientras que la proporción de 0,5 y menos fue considerada como expresión regulada por disminución. Una proporción de 1,5 o mayor fue considerada como regulación por aumento del gen.

40

Tabla 3: expresión ERG en PBMNCs tras la exposición a un agente antiinflamatorio como se estudió por el perfil de expresión basado en micromatriz

	P979			Rolipram
Concentración de fármaco	0,3 mM	1,0 mM	3,0 mM	300 mM
Intensidad de la proporción	1,42	2,63	2,95	1,03

45

50 Como se muestra en los datos anteriores, la expresión del gen de epirregulina está regulada por aumento selectivamente por agentes antiinflamatorios de una manera dependiente de la concentración, pero no por el compuesto de control Rolipram.

Confirmación de los datos obtenidos de la Micromatriz:

55

[0038] Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR): Para confirmar los datos obtenidos de la micromatriz, realizamos una RT-PCR usando cebadores específicos para el gen de la epirregulina.

60 [0039] La expresión EREG en los PBMNCs tras la exposición al agente antiinflamatorio fue confirmada por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). El perfil de la expresión del gen basada en micromatriz estudió la expresión del gen a gran escala. La RT PCR enfocada en el gen/genes de interés y el análisis de expresión fueron llevados a cabo bajo condiciones experimentales similares.

60

65 Cebador Izquierda CGTGTGGCTCAAGTGTCAAT;
Cebador Derecha TGGAACCGACGACTGTGATA;
Tamaño del producto: 235 pares de base.

Tabla 4: Las secuencias de ADN para los cebadores están expresadas en negrita, cursiva y subrayadas en la secuencia de ADN de la epirregulina. Secuencia del ADN de la Epirregulina Humana (NM_001432, HUMAN_EREG)

1 agccccagcgccccgctcccatcgccg**ATG**ACCGCGGGGAGGAGGATGGAGATGCTCTGTG
 61 CCGGCAGGGTCCCTGCGCTGCTGCTGCCTGGGTTCATCTTCTACAGGCAGTCCTCA
 121 GTACAACTGTGATTCCATCATGTATCCCAGGAGAGTCCAGTGATAACTGCACAGCTTTAG
 181 TTCAGACAGAAGACAATCCA**CGTGTGGCTCAAGTGTCAATA**ACAAAGTGTAGCTCTGACA
 241 TGAATGGCTATTGTTTGCATGGACAGTGCATCTATCTGGTGGACATGAGTCAAACTACT
 301 GCAGGTGTGAAGTGGTTATACTGGTGTCCGATGTGAACACTTCTTTTTAACCGTCCACC
 361 AACCTTTAAGCAAAGAGTATGTGGCTTTGACCGTGATTCTTATTATTTTGTCT**TATCA**
 421 **CAGTCGTCGGTTCCA**CATATTATTTCTGCAGATGGTACAGAAATCGAAAAGTAAAGAAC
 481 CAAAGAAGGAATATGAGAGAGTTACCTCAGGGGATCCAGAGTTGCCGCAAGTCTGAatgg
 541
cgccatcaaacttatgggca

5 **[0040]** La alícuota de las muestras de ARN como se usa en el estudio de micromatriz fue usada para el análisis RT-PCR. El experimento fue llevado a cabo usando un kit cMaster™ RTplusPCR System de Eppendorf usando el protocolo como se proporciona en el kit. Brevemente, el ADNc fue sintetizado usando ARN de varias fuentes como se muestra en los resultados y posteriormente cuantificado durante el paso de amplificación por la incorporación del colorante verde Syber en los amplicones.

[0041] El análisis RT-PCR confirmó el descubrimiento de la activación específica del EREG en respuesta al P979 a ciertas concentraciones de fármaco (Tabla 5)

Tabla 5- Expresión EREG en el PBMC tras el tratamiento con P979 y Rolipram

Fármaco Usado	Concentración (mM)	Cambio Log-fold
P979	0,3	0,93
	0,3	1,3
	1	3,4
	3	3,2
	3	2,0
Rolipram	10	1,2

10 **[0042]** Cabe señalar que, como se usa en esta especificación y las reivindicaciones añadidas, las formas singulares “una” y “el” incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a una composición que contiene “un compuesto” incluye una mezcla de dos o más compuestos. También cabe señalar que el término “o” es generalmente empleado en su sentido incluyendo “y/o” a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

15 **[0043]** Todas las publicaciones y solicitudes de patente en esta especificación son indicativas del nivel de conocimiento ordinario en la técnica a las que esta invención pertenece.

20 **[0044]** La invención ha sido descrita con referencia a varias realizaciones y técnicas específicas y preferidas. Sin embargo, se debe entender que se pueden hacer muchas variaciones y modificaciones que permanecen dentro del ámbito de la invención.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para predecir la respuesta de un paciente a un fármaco empleado en el tratamiento de una condición inflamatoria en el paciente, el método comprende: determinar el nivel de la expresión del gen de epirregulina en la muestra de sangre del paciente; y predecir la respuesta del paciente al fármaco empleado en el tratamiento de la condición inflamatoria.
- 10 **2.** El método de la reivindicación 1, en donde el nivel de la expresión del gen de epirregulina es elevado en la muestra de sangre del paciente.
- 3.** El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la condición inflamatoria comprende artritis reumatoide, psoriasis, dermatitis atópica, artritis psoriásica, artritis reumatoide juvenil, o una combinación de las mismas.
- 15 **4.** Un método para monitorizar la respuesta al fármaco en un paciente que está recibiendo tratamiento para una condición inflamatoria, el método comprende: determinar el nivel de proteína de epirregulina en la muestra de suero del paciente; y monitorizar la respuesta al fármaco en el paciente que está recibiendo tratamiento para una condición inflamatoria.
- 20 **5.** El método de la reivindicación 4, en donde el nivel de proteína de epirregulina es elevado en la muestra de suero del paciente.
- 25 **6.** El método de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde la condición inflamatoria comprende artritis reumatoide, psoriasis, dermatitis atópica, artritis psoriásica, artritis reumatoide juvenil, o una combinación de las mismas.
- 7.** Un método para determinar la probabilidad de que un sujeto desarrolle una condición inflamatoria, el método comprende: determinar el nivel de la expresión del gen de epirregulina en la muestra de sangre del sujeto.
- 30 **8.** El uso de la proteína de epirregulina sola o en combinación con al menos un compuesto antiinflamatorio en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la artritis reumatoide o la artritis reumatoide juvenil.
- 9.** El uso de la reivindicación 8, en donde la epirregulina es administrada como una formulación oral, parenteral, subcutánea o tópica.
- 35 **10.** Un método para monitorizar la respuesta al fármaco en un paciente que está recibiendo tratamiento para una condición inflamatoria con un compuesto antiinflamatorio, el método comprende: medir la expresión del gen de epirregulina en la sangre del paciente o la muestra de suero para niveles elevados de la expresión del gen de epirregulina; y monitorizar la respuesta al fármaco en el paciente que está recibiendo el tratamiento para la condición inflamatoria con el compuesto antiinflamatorio.
- 40 **11.** La Proteína de epirregulina para el uso en el tratamiento de la artritis reumatoide o la artritis reumatoide juvenil.
- 45 **12.** La proteína de epirregulina en combinación con al menos un compuesto antiinflamatorio para el uso en el tratamiento de la artritis reumatoide o la artritis reumatoide juvenil.
- 13.** La proteína de epirregulina de la reivindicación 11 o la combinación de la reivindicación 12, un una forma adecuada para la administración oral, parenteral, subcutánea o tópica.