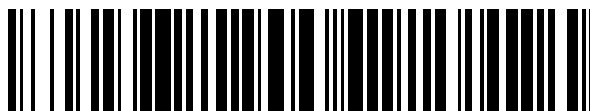


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 628**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08860427 .7**
96 Fecha de presentación: **11.12.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2232268**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.09.2010**

54 Título: **Uso de genes KIR para predecir respuesta a terapia**

30 Prioridad:
11.12.2007 GB 0724131

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.07.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSITY OF ULSTER
CROMORE ROAD, COLERAINE
COUNTY LONDONDERRY BT52 1SA, GB**

72 Inventor/es:
**BERRAR, Daniel;
BJOURSON, Anthony y
MCGEOUGH, Cathy**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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 2 385 628 T3

DESCRIPCIÓN

Uso de genes KIR para predecir respuesta a terapia.

Antecedentes

Los receptores similares a inmunoglobulina de células asesinas (KIR) son los principales productos de la agrupación del gen complejo receptor de leucocitos, localizada en el cromosoma humano 19q13.4. Esta familia de receptores polimórficos puede ser de función tanto activante (2DS/3DS) como inhibidora (2DL/3DL) y modulan la función de células asesinas naturales (NK) y de linfocitos T mediante el reconocimiento de moléculas de clase I del antígeno leucocitario humano (HLA) de histocompatibilidad sobre células diana. La integración de señales activadoras e inhibidoras transducidas por KIR sobre subconjuntos de NK y linfocitos T desempeña una función en el mantenimiento de un equilibrio entre la vigilancia inmunitaria eficaz y la reacción autoinmunitaria. Hasta la fecha se han identificado 15 genes *KIR*, de los que los tipos *2DS/2DL* son quizás los mejor caracterizados. *KIR2DL2* y *KIR2DL3* inhibidores reconocen ligandos del grupo 1 de HLA-C. Sin embargo, su receptor activador correspondiente *KIR2DS2* demuestra poca o no demuestra afinidad de unión por estos ligandos. *KIR2DL1* inhibidor reconoce ligandos del grupo 2 de HLA-C y, similarmente, su receptor activador correspondiente *KIR2DS1* se une con mucha menos afinidad. Los individuos pueden ser homocigotos (C1/C1, C2/C2) o heterocigotos (C1/C2) para HLA-C1 o -C2. Si un individuo carece del ligando para un KIR particular, entonces ese KIR se considera normalmente no funcional.

Dentro del repertorio de receptores de NK, los KIR son una familia de receptores clave que regulan la actividad de células NK. Además de su función innata, las células NK tienen el potencial de interactuar con componentes del sistema inmunitario adaptativo, que incluyen linfocitos T y células dendríticas. Esta función dual de las células NK sugiere su probable implicación en respuestas inmunitarias autorreactivas tales como artritis reumatoide (AR). Los KIR también están presentes en linfocitos T CD8⁺ y linfocitos T CD4⁺CD28^{null}, confirmando su implicación adicional en inmunidad adaptativa.

Sin embargo, la función precisa para KIR en linfocitos T sigue sin ser clara. Se especula que pueden soportar la capacidad para escapar del ataque de linfocitos T citotóxicos, que reaccionan con autoantígenos. De forma interesante, se encontró que la expresión de *KIR2DL1/2DS1* en una población de linfocitos T CD8⁺ era sorprendentemente menor en pacientes con AR en comparación con controles sanos. La regulación por disminución de *KIR2DL1* inhibidor en estos linfocitos T podría reducir el umbral para la iniciación de una respuesta inmunitaria.

Las enfermedades autoinmunitarias afectan a millones de personas en todo el mundo y, con más de 70 tipos distintos de patologías asociadas a procesos autoinmunitarios, representan un área amplia y de rápido movimiento de investigación e interés clínico. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), en particular, emergió de estos estudios como un mediador inflamatorio clave en el proceso inflamatorio crónico, que actúa de regulador fundamental de la expresión de otras citocinas pro-inflamatorias tales como interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6). Por tanto, TNF α se ha convertido en una diana clave para intervención terapéutica en el ámbito de las enfermedades autoinmunitarias. En los últimos años se han autorizado varios fármacos derivados biotecnológicamente que eligen TNF α como diana, cambiando en profundidad la terapia de varias enfermedades autoinmunitarias basadas en inflamación.

A este respecto, se han desarrollado dos formas distintas de agentes biológicos que eligen TNF como diana, concretamente anticuerpos monoclonales (MAb) y receptores de TNF solubles dímeros. Ambos tipos de agentes biológicos están autorizados para uso clínico para diferentes indicaciones:

Infliximab (Remicade[®]) es un MAb IgG1 quimérico que se une a TNF α y TNF β y lisa células productoras de TNF para neutralizar su actividad. La Agencia estadounidense del medicamento (FDA) lo ha autorizado para el tratamiento de psoriasis, enfermedad de Crohn pediátrica, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, artritis psoriásica, artritis reumatoide y colitis ulcerosa.

Etanercept (Enbrel[®]) es un dímero recombinante de proteínas de receptores de TNF p75 humanos fusionado y unido a IgG1 humana que actúa competitivamente para inhibir la unión de TNF a su receptor de la superficie celular, originalmente autorizado en 1998 por la FDA para tratar la dolorosa hinchazón de articulaciones y el deterioro producido por artritis reumatoide. Hasta la fecha no se ha mostrado que etanercept sea eficaz en el tratamiento de enfermedad de Crohn.

Adalimumab (Humira)[™] es un MAb anti-TNF α humanizado que se une con alta afinidad a TNF α . A partir de febrero de 2007, adalimumab ha sido autorizado para el tratamiento de artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante y enfermedad de Crohn. Se han enviado datos a la FDA para ampliar la marca para incluir el tratamiento de psoriasis en placas. La sustitución de elementos murinos con humanos ha producido una reducción en la producción de anticuerpos que neutralizan adalimumab.

Rituximab, comercializado bajo los nombres comerciales Rituxan[®] y MabThera[®], un anticuerpo monoclonal quimérico, es una terapia más recientemente autorizada basada en TNF- α autorizada para artritis reumatoide.

Nuevos agentes biológicos tales como antago de TNF α han mostrado una eficacia sorprendente en el tratamiento de enfermedades tales como artritis reumatoide, pero el 20-40% de los pacientes no responden a terapia, y actualmente no hay marcadores predictivos clínicamente útiles de respuesta al tratamiento. Esto es agravado por el hecho de que los fármacos anti-TNF α son muy caros, costando más de 8000€ por paciente por año (en 2007 en el Reino Unido), y los pacientes reciben tratamiento durante 3-6 meses antes de que pueda determinarse la respuesta clínica. La capacidad para segregar pacientes en cohortes que responderán, o no responderán, a tratamiento es un requisito urgente. Tal enfoque de medicina personalizada en la que los tratamientos son confeccionados a medida para el cumplimiento genético del individuo representa el uso más rentable de presupuestos sanitarios y evita efectos secundarios evitables para aquellos pacientes que no dan beneficio clínico. Por tanto, la capacidad para predecir la respuesta a terapia anti-TNF α encontraría utilidad universal en la gestión clínica de pacientes con enfermedades autoinmunitarias, tales como AR.

Un objeto de la presente invención es predecir prospectivamente la probable respuesta clínica de pacientes a agentes terapéuticos usados en terapia con TNF, basándose en el genotipo del paciente, en particular evaluando la presencia, ausencia o nivel cuantitativo de al menos un gen *KIR*, y evaluando la presencia, ausencia o nivel cuantitativo de un gen que codifica un ligando *KIR*.

Resumen de la invención

Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona el uso de al menos un gen *receptor similar a inmunoglobulina de células asesinas* seleccionado de 2D52 y 2DL2; y un gen que codifica y ligando *KIR* seleccionado del grupo 1 de HLA-C y el grupo 2 de HLA-C; para la identificación de sujetos que probablemente responden a terapia basada en anti-factor de necrosis tumoral.

Según un segundo aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de identificación de sujetos que probablemente responden a terapia basada en factor de necrosis tumoral, procedimiento que comprende las etapas de evaluar la presencia, ausencia o nivel cuantitativo de al menos un gen *KIR* seleccionado de 2D52 y 2DL2 para un sujeto; o evaluar la presencia, ausencia o nivel cuantitativo de un producto de expresión codificado por el gen; evaluar la presencia, ausencia o nivel cuantitativo de un gen que codifica y ligando *KIR* seleccionado del grupo 1 de HLA-C y el grupo 2 de HLA-C; o evaluar la presencia, ausencia o nivel cuantitativo de un producto de expresión codificado por el gen; y estratificar el sujeto basándose en la presencia, ausencia o nivel cuantitativo del al menos un gen *KIR* o basándose en la presencia, ausencia o nivel cuantitativo de un producto de expresión codificado por el gen; y la presencia, ausencia o nivel cuantitativo del gen que codifica el ligando *KIR* o basándose en la presencia, ausencia o nivel cuantitativo de un producto de expresión codificado por el gen.

Para los fines de esta memoria descriptiva, el uso se determina por una combinación de factores, siendo uno o más de los cuales la presencia o ausencia de un gen o nivel cuantitativo de un gen, y siendo el otro la presencia o ausencia de un producto de expresión codificado por ese gen o nivel cuantitativo de un producto de expresión codificado por ese gen. El uso puede determinarse evaluando factores que incluyen, pero no se limitan a, la presencia o ausencia de un gen *KIR*, el nivel de un gen *KIR*, la presencia o ausencia del gen que codifica su ligando correspondiente y el nivel del gen que codifica su ligando correspondiente. Opcionalmente o adicionalmente, el uso puede determinarse evaluando factores que incluyen, pero no se limitan a, la presencia o ausencia de un producto de expresión de un gen *KIR*, el nivel de un producto de expresión de un gen *KIR*, la presencia o ausencia de su ligando correspondiente y el nivel de su ligando correspondiente.

El gen *KIR* puede evaluarse evaluando el haplotipo del sujeto. Por el término "haplotipo" se indica una región de un cromosoma, que comprende una serie de genes, en cualquier número o combinación. En el presente caso, el haplotipo puede comprender cualquiera de los genes *KIR*, que incluye genes *KIR* activadores, genes *KIR* inhibidores, pseudogenes *KIR* y genes *KIR* de la región estructural. Para los fines de la presente memoria descriptiva, un haplotipo del grupo B comprende uno o más de los genes seleccionados de *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5*, *KIR2DL2* y *KIR3DS1*. Un haplotipo del grupo A se define por la ausencia de uno cualquiera de los genes seleccionados de *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5*, *KIR2DL2* y *KIR3DS1*. Opcionalmente, un haplotipo del grupo A comprende uno o más de los genes seleccionados de *KIR2DS4*, *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2* y *KIR3DL3*.

Opcionalmente, la presencia de *2DS2* define un haplotipo del grupo B. Más opcionalmente o adicionalmente, la presencia de *2DL2* define un haplotipo del grupo B. Opcionalmente, un haplotipo del grupo B es indicativo de que un sujeto responderá (es un paciente que responde al tratamiento).

Opcionalmente o adicionalmente, en un haplotipo que comprende al menos un gen *KIR* activador y al menos un gen *KIR* inhibidor, la presencia, ausencia o nivel cuantitativo del al menos un gen *KIR* puede evaluarse por la diferencia en el número de genes *KIR* activadores y el número de genes *KIR* inhibidores en una muestra biológica adecuada que comprende material genético de un sujeto. Más opcionalmente, en un haplotipo que comprende al menos un gen *KIR* activador y al menos un gen *KIR* inhibidor, el número de genes *KIR* activadores que es superior al, o igual al, número de genes *KIR* inhibidores es indicativo de que un sujeto responderá (es un paciente que responde al tratamiento).

Opcionalmente, la presencia de un haplotipo del grupo B es indicativo de que un sujeto responderá (es un paciente que responde al tratamiento). Más opcionalmente, la presencia de un gen *KIR* activador es indicativo de que un sujeto responderá (es un paciente que responde al tratamiento). Todavía más opcionalmente, el número de genes *KIR* activadores que es superior al, o igual al, número de genes *KIR* inhibidores es indicativo de que un sujeto responderá (es un paciente que responde al tratamiento).

El al menos un gen *KIR* se selecciona del grupo que comprende aquellos genes *KIR* que son de función activante, y aquellos genes *KIR* que son de función inhibidora. Opcionalmente, el gen *KIR* se selecciona de los genes que son de función activante. Los genes *KIR* activantes pueden seleccionarse del grupo que comprende, pero no se limita a, *2DS2*, *2DS4*, *2DS1*, *2DS3*, *2DS5* y *3DS1*. Más opcionalmente, el gen *KIR* es *2DS2*. Opcionalmente o adicionalmente, el gen *KIR* se selecciona de los genes que son de función inhibidora. Los genes *KIR* inhibidores pueden seleccionarse del grupo que comprende, pero no se limita a, *2DL1*, *2DL4*, *2DL3*, *2DL5A*, *2DL5B*, *2DL2*, *3DL2*, *3DL1* y *3DL3*. Más opcionalmente o adicionalmente, el gen *KIR* es *2DL2*. Además, los genes *KIR* también pueden seleccionarse del grupo que comprende aquellos genes *KIR* que son de función activante y aquellos genes *KIR* que son de función inhibidora, en cualquier número o combinación. Opcionalmente, los genes *KIR* incluyen *2DS2* y/o *2DL2*.

Opcionalmente, el uso se determina por la presencia o ausencia de un gen *KIR* activador. Más opcionalmente, el uso se determina por la presencia o ausencia de *KIR2DS2*. Todavía más opcionalmente, el uso se evalúa por la presencia o ausencia del gen que codifica el grupo 1 de HLA-C.

Opcionalmente o adicionalmente, el uso se determina por la presencia o ausencia del producto de expresión de un gen *KIR* activador. Más opcionalmente o adicionalmente, el uso se determina por la presencia o ausencia de un producto de expresión de *KIR2DS2*. Todavía más opcionalmente o adicionalmente, el uso se evalúa por la presencia o ausencia de un producto de expresión del gen que codifica el grupo 1 de HLA-C.

Opcionalmente o adicionalmente el uso, se determina por la presencia o ausencia de un gen *KIR* inhibidor. Más opcionalmente o adicionalmente, el uso se determina por la presencia o ausencia de *KIR2DL2*. Todavía más opcionalmente o adicionalmente, el uso se evalúa por la presencia o ausencia del gen que codifica el grupo 2 de HLA-C.

Opcionalmente o adicionalmente, el uso se determina por la presencia o ausencia del producto de expresión de un gen *KIR* inhibidor. Más opcionalmente o adicionalmente, el uso se determina por la presencia o ausencia de un producto de expresión de *KIR2DL2*. Todavía más opcionalmente o adicionalmente, el uso se evalúa por la presencia o ausencia de un producto de expresión del gen que codifica el grupo 2 de HLA-C.

Los ligandos *KIR* correspondientes pueden seleccionarse del grupo que comprende, pero no se limita a, grupo 1 de HLA-C y grupo 2 de HLA-C.

Se prevé que un enfoque basado en genómica tal como PCR-SSOP pueda usarse para determinar factores tales como transporte por vehículo de un gen *KIR*, y el haplotipo de su ligando correspondiente. Sin embargo, se aprecia que puede adaptarse una diversa gama de metodologías para cribar según tales análisis de variación genética (véanse los ejemplos tratados en Syvanen, 2001. *Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. Nature Reviews Genetics*), metodologías que pueden emplearse, incluyen: PCR cuantitativa (Q-PCR), micromatriz de tejido (TMA), análisis de polimorfismos de la longitud del fragmento de restricción (RFLP) o análisis de secuencias de nucleótidos. Los procedimientos más contemporáneos pueden implicar, como primera etapa, la amplificación por PCR de la región genómica apropiada, o implicar transcripción inversa del ARNm apropiado. El producto de PCR así obtenido puede entonces someterse a análisis de secuencias, por ejemplo, por secuenciación de masas (véase Tost & Gut, 2002. *Genotyping single nucleotide polymorphisms by mass spectrometry. Mass spectrometry Reviews*, 21:6, 3880). Otros procedimientos ampliamente usados que serían fácilmente adaptados incluyen hibridación, ligación, extensión de cebadores, escisión enzimática específica para alelo o HPLC desnaturizante. Estos ejemplos no pretenden ser limitantes, y un experto en la materia podrá determinar una técnica apropiada.

Opcionalmente, el uso puede incluir evaluar factores tales como el nivel de proteínas expresadas por un gen *KIR*, y el nivel de proteínas de su ligando correspondiente.

Además de análisis específicos de la secuencia de ácidos nucleicos, una alternativa sería examinar el componente de proteína codificado por tales secuencias de ácidos nucleicos. Esto podría permitir el tipado molecular usando procedimientos tales como secuenciación de aminoácidos de proteína apropiadamente aislada o usando anticuerpos específicos para el (los) epítipo(s) de HLA y/o *KIR* de interés. Se prevé que un enfoque basado en proteómica tal como transferencia Western pueda usarse para determinar factores tales como el nivel de una proteína de *KIR*, y su ligando correspondiente. Sin embargo, se aprecia que puede emplearse cualquier otra metodología adecuada, que incluye: enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) o análisis de secuencias de aminoácidos. Estos ejemplos no pretenden ser limitantes, y un experto en la materia podrá determinar una técnica apropiada.

Preferentemente, una combinación de al menos un par de un gen *KIR* y su ligando correspondiente se evalúa para determinar la presencia, ausencia o nivel cuantitativo del gen *KIR*. Opcionalmente también pueden usarse en combinación otros factores tales como la puntuación DAS28 para estratificar el sujeto.

- 5 El término “DAS28” pretende incluir “Puntuación de la actividad de la enfermedad”, “DAS-CRP” y “DAS-proteína C reactiva” y se refiere a un índice clínico combinado para medir la actividad de la enfermedad en sujetos con AR. El índice DAS28 puede incluir el recuento de 28 articulaciones no graduadas para dolor con la palpación e hinchazón, y puede basarse en la diferencia entre dos puntuaciones de DAS28 evaluadas en momentos de tiempo separados, indicando la diferencia una mejora o disminución en la respuesta clínica.

Opcional o adicionalmente, el uso se determina usando otros factores tales como la puntuación DAS28.

- 10 Preferentemente, el uso se determina por la presencia o ausencia de los genes *KIR* seleccionados de *2DS2* y *2DL2*, y usando la puntuación DAS28.

Las interacciones de los KIR de dos dominios están mucho mejor definidas que las de los restantes KIR. KIR3DL1 interactúa con moléculas de HLA-B con un epítipo Bw4, mientras que KIR3DL2 reacciona con proteínas de HLA-UA particulares y se cree que KIR2DL4 se pone en contacto con moléculas de HLA-G.

- 15 La terapia basada en TNF es cualquier intervención terapéutica que elige la señalización de TNF como diana. Opcionalmente, la intervención terapéutica comprende activar la señalización de TNF usando, por ejemplo, agonistas de TNF. Preferentemente, la intervención terapéutica comprende inhibir la señalización de TNF. Más preferentemente, la intervención terapéutica comprende inhibir la señalización de TNF α usando, por ejemplo, antagonistas de TNF α .

- 20 Los antagonistas de TNF α (tales como etanercept, infliximab y adalimumab) están indicados para afecciones inflamatorias en las que TNF α es un mediador crítico de la patogénesis de la enfermedad. Estos incluyen, pero no se limitan a, psoriasis en placas, artritis psoriásica, artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

- 25 Opcionalmente, puede usarse un modelo para clasificar un sujeto. Preferentemente, el modelo se basa en un procedimiento de analítica predictiva. Preferentemente, el procedimiento de analítica predictiva es un modelo estadístico. Más preferentemente, se basa en un clasificador lineal. Lo más preferentemente, se basa en un análisis discriminante lineal de Fisher (LDA). Aunque se observará que cualquier técnica de analítica predictiva puede utilizarse en el procedimiento de diseño y/o refinado del modelo.

Preferentemente, el modelo calcula la probabilidad posterior de un resultado dado.

- 30 Preferentemente, el resultado dado es que un sujeto responderá (es un paciente que responde al tratamiento).

Preferentemente, la probabilidad posterior se usa para tomar una decisión.

Preferentemente, el valor crítico superior es 0,65. Aunque se observará que el valor crítico superior puede alterarse basándose en el refinado del modelo.

- 35 Para los fines de la presente memoria descriptiva, se entiende que la presente invención no se limita a los procedimientos específicos, pauta de tratamientos o procedimientos particulares, que como tales pueden variar. Además, la terminología usada en este documento es con el fin de describir realizaciones particulares y no pretende ser limitante.

Por el término “sujeto” se indica un individuo. Preferentemente, el sujeto es un mamífero. Más preferentemente, el sujeto es un ser humano.

- 40 Como se usa en todo el documento, la nomenclatura de KIR tal como “2DS2” pretende ser sinónima a la nomenclatura “KIR2DS2”.

Breve descripción de los dibujos

Ahora se describirá una realización de la invención, a modo de ejemplo con referencia a los dibujos adjuntos, en la que:

- 45 La **Figura 1** ilustra el efecto de los genotipos (I-IV) de KIR2DS2 y HLA-C sobre la respuesta clínica; la **Figura 2A** ilustra diferencias en las puntuaciones DAS28 antes y después del tratamiento de los genotipos (I-IV) de KIR2DS2 y HLA-C; la **Figura 2B** ilustra diferencias en las puntuaciones DAS28 antes y después del tratamiento entre dos genotipos (I y IV) de KIR2DS2 y HLA-C;
- 50 la **Figura 3** ilustra una característica operativa del receptor (ROC) del clasificador KIR2DS2; la **Figura 4** es un diagrama esquemático que ilustra un modelo de soporte a decisiones que encapsula el clasificador discriminante lineal; y

la **Figura 5** ilustra la frecuencia de haplotipos de KIR en pacientes con artritis reumatoide (AR) y controles.

Pacientes y procedimientos

Pacientes

- El grupo de pacientes comprendió 70 caucásicos norirlandeses sin parentesco con artritis reumatoide crónica. Cada sujeto fue un paciente que acudía al Departamento de reumatología del Hospital Musgrave Park, Belfast, Irlanda del Norte, Reino Unido. Todos los pacientes cumplieron los criterios revisados en 1987 por el Colegio americano de reumatología para AR y tenían enfermedad activa como se indica por una puntuación de la actividad de la enfermedad en 28 articulaciones (DAS28) de $>3,2$. No hubo diferencia significativa en la distribución de edad o sexo entre pacientes que respondían al tratamiento y pacientes que no respondían al tratamiento.
- Sesenta y cuatro pacientes se asignaron a tratamiento anti-TNF- α (adalimumab, etanercept o infliximab) cuando habían fracasado al menos dos otros fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD). Cuarenta pacientes recibieron adalimumab, 15 etanercept y 9 infliximab. En la mayoría de los casos, el metotrexato (MTX) se mantuvo como una terapia de combinación y se permitió que los pacientes continuaran con glucocorticoides orales. Se recogieron muestras de sangre periférica de cada paciente en el tiempo 0. Tras tres meses de tratamiento, a los pacientes se les asignó a un estado de paciente que responde al tratamiento o paciente que no responde al tratamiento basándose en su mejora de la puntuación DAS28. Véase la Tabla 1.

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de pacientes con AR

Valores de p determinados para la prueba de la t de Student comparan grupos de pacientes que responden al tratamiento y pacientes que no responden al tratamiento con grupos de terapia con anti-TNF- α . Las puntuaciones DAS28 previas se calcularon en el tiempo 0, antes de empezar el tratamiento con anti-TNF- α , las puntuaciones DAS28 posteriores se toman tres meses después.

	Pacientes que responden al tratamiento	Pacientes que no responden al tratamiento	Todos	Valor de P
Total	34	30	64	-
Edad media (años)	57,97 (intervalo, 35-75)	54,53 (intervalo, 27-73)	56,33 (intervalo, 27-75)	0,21
Mujer/hombre	28/6	26/4	54/10	0,74
Puntuación DAS28 previa media	6,21 (intervalo, 4,08-8,96)	5,43 (intervalo, 3,75-7,38)	5,85 (intervalo, 3,75-8,96)	0,004
Puntuación DAS28 posterior media	3,64 (intervalo, 1,18-6,15)	5,61 (intervalo, 3,49-7,27)	4,53 (intervalo, 1,18-7,27)	$4,2 \times 10^{-8}$

- Dentro de la población con AR, 64 de 70 pacientes tuvieron datos disponibles de desenlace clínico. Dentro de este grupo de 64 pacientes (descrito en la Tabla 1), 34 fueron pacientes que respondieron al tratamiento (53,0%) y 30 fueron pacientes que no respondieron al tratamiento (47,0%). La puntuación DAS28 media de pacientes que respondieron al tratamiento (6,21) en el nivel inicial fue significativamente superior a la de pacientes que no respondieron al tratamiento (5,43) en este momento de tiempo ($P = 0,004$).

- Para fines de comparación se incluyó una población de control de 100 caucásicos norirlandeses sanos sin parentesco seleccionados al azar. Las muestras de sangre de control sanas se recogieron en los Servicios de transfusión de sangre de Irlanda del Norte, Belfast, Irlanda del Norte, Reino Unido. Todos los participantes en el estudio dieron el consentimiento informado escrito y el estudio tuvo la aprobación del comité ético local.

Genotipado de KIR

- Se extrajo ADN genómico de linfocitos de la sangre periférica usando el procedimiento de precipitación por sales como se ha descrito previamente en Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988;16:1215. El ADN se tipó para la presencia o ausencia de genes *KIR* de la región estructural: KIR2DL4, KIR3DL2, KIR3DL3 y KIR3DP1, seis KIR activadores (KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5 y KIR3DS1) y cinco KIR inhibidores (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR2DL5). KIR2DP1 también se incluyó en el tipado. El genotipado de KIR se realizó usando los cebadores de PCR y las sondas del procedimiento de sondas de oligonucleótidos específicas para la secuencia de PCR (PCR-SSOP) previamente descrito en Middleton D, Williams F, Halfpenny IA. KIR genes. Transpl Immunol 2005;14:135-42. En el procedimiento de tipado se incluyeron los controles positivos de genotipo de KIR conocido,

que incorporan en conjunto todos los genes KIR. Las reacciones de PCR se usaron para amplificar tanto las regiones D1/D2 como las transmembrana/citoplásmicas (T/C) de los genes *KIR*. En cada reacción, 0,1 µg de ADN se amplificó en una reacción de 100 µl que contiene 10 µl de 10 x reacción tampón (que contiene (NH₄)₂SO₄ 16 mM, Tris-HCl 67 mM a pH 8,8 a 25°C, 0,1% de Tween-20), MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,2 mM, 0,2 µM de cada uno de cebador directo e inverso (Tabla 2) y 3 U de *Taq* ADN polimerasa (Bioline, Irlanda).

Tabla 2. Cebadores para el genotipado de PCR-SSOP

Se enumeran los cebadores del dominio 1 y 2 de KIR y del dominio transmembrana/citoplásmico usado en PCR-SSOP. X es la base universal inosina.

Región	Cebadores	5'- Secuencia -3'	Posición	Producto
D1/D2	DIF	AGAGAXXGTCATCCTGCA(A/G)TGTTGGTC	Ex 4 56-82	
	D2RR2	CTCACCTXTGAC(G/A)GAAACAAGCAGTGG	Int 5-273 Ex 5	2100 pb
T/C	TMF1	GCTGTGATTAGGTACTCAGTGGCC	Ex 7 21-44	
	TMF2	GTTCTGATTGGGACCTCAGTGGTC	Ex 7 21-44	
	TMF3	ATTCTGATTGGGACCTCAGTGGCT	Ex 7 21-44	950 pb
	DmcytR	TTGAGACAGGGCT(G/A)TTGTCTCC	Ex 9 232-211	
HLA-C	5Cin1-61	AGCGAGG(G/T)GCCCCGCCGCGA	Int 1 42-61	937 pb
	3BCIn3-12	GGAGATGGGGAAGGCTCCCCACT	Int 3 35-12	

Las condiciones de PCR para la amplificación de D1/D2 consistieron en una desnaturalización inicial a 96°C durante 5 minutos, 30 ciclos de 96°C durante 1 minuto, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto y una etapa de extensión final a 72°C durante 10 minutos (ciclador térmico 9700, Applied Biosystems). La amplificación de T/C se realizó con las mismas condiciones aumentando el número de ciclos a 38 y el tiempo de extensión del ciclo a 90 segundos. Los productos amplificados (2,1 kb) se visualizaron en un 1,5% de gel de agarosa a 150 V durante 20 minutos. Entonces, los productos se transfirieron por puntos sobre membranas de nailon en una forma de 8 x 12. Se realizó la hibridación de sondas marcadas con digoxigenina específicas para KIR. Las secuencias de sondas y las condiciones de hibridación se facilitan en la Tabla 3. Las reacciones de sonda positivas se determinaron mediante detección quimioluminiscente y se capturaron sobre una película de rayos X. En el procedimiento de tipado se incluyeron controles positivos del genotipo de KIR conocido, que incorporan en conjunto todos los genes *KIR*.

Tabla 3. Sondas de oligonucleótidos específicas para secuencia usadas para la identificación de KIR y HLA-C1/C2

Las 19 sondas de KIR son aquellas descritas por Middleton D, Williams F, Halfpenny IA. *KIR genes*. *Transpl Immunol* 2005;14:135-42. La sonda 2DL1-D1 está en dirección antisentido. Las sondas de HLA-C C293 y C291 se toman de Williams F, Meenagh A, Patterson C, Middleton D. *Molecular diversity of the HLA-C gene identified in a Caucasian population*. *Hum Immunol* 2002 63:602-13. Las posiciones se toman del codón de iniciación ATG. Las concentraciones de sonda se facilitan en picomoles (pm).

Región	Sonda	5'- Secuencia -3'	Temp de lavado (°C) / concentración temp (pm)	Posición
D1	Ig2 3DL2	TACAGATGTTATGGTTCT	48°C/20pm	Ex 4 222-239
	Ig2 2DS2	GGGGAAGTATAAGGACA	48°C/30pm	Ex 4 119-135
	Ig2 2DS4	TTCTCCATTGGTCCCAT	48°C/20pm	Ex 4 183-199
	Ig2 2DS3	CTATCAGTTTTTCAGCTCC	52°C/20 pm	Ex 4 254-271

(continuación)

Región	Sonda	5'- Secuencia -3'	Temp de lavado (°C) / concentración temp (pm)	Posición
D2	Ig2 Z (2DP1)	CCATGATGGAAGACCTG	52°C/30 pm	Ex 4 196-212
	Ig2 2DS5a	ACGTTTAACCACACTTTG	50°C/20 pm	Ex 4 123-140
	Ig2 X (3DP1)	GAAGTTTAATGACACTTTG	50°C/20 pm	Ex 4 122-140
	Ig2 3DL3	CACGATGCGGGTTCCCAG	60°C/20 pm	Ex 4 159-276
	2DL1-D1 ^a	AGCTGACACCTGATAGG	58°C/20 pm	Ex 4 253-269
	Ig2 2DS1agg	CCATCAGTCGCATGAGGCAAG	66°C/100 pm	Ex 4 187-207
	Ig2 2DS1AgA2	CCATCAGTCGCATGAAGCAAG 64°C/50 pm		Ex 4 187-207
	Ig1 2DS4del	CTGCAGCT-22bp-CCATCTAT	48°C/20 pm	Ex 4 74-111
	Ig1 2DL2	CCATGAATGTAGGTTC	46°C/20 pm	Ex 4 128-143
T/C	NK1 2DL1	TCTGCAGGAAACAGAAC	50°C/20 pm	Ex 8 24-40
	NK 2DL5	CATTGCTGCTGCTCCA	50°C/20 pm	Ex 7 81-96
	NK8 (3DS1)	GGAACAGAA-2bp-GTGAACAG	50°C/20 pm	Ex 8 31-49
	NK3 (2DL3)	CTGGTGCTGCAACAAA	48°C/20 pm	Ex 7 86-110
	NK10 (2DL4)	GCCTGCGGGACACAGAAC	60°C/20 pm	Ex 8 23-40
	NK6 (3DL1)	CAGAACAGCCAACAGCGA	56°C/20 pm	Ex 8 35-52
HLA-C	C293 (HLA-C 1)	ACCGAGTGAGCCTGCG	54°C/20 pm	Ex 2 220-235
	C291	(HLA-C2)TGACCGAGTGAACCTGC	54°C/25 pm	Ex 2 218-234

Genotipado de HLA-C

- 5 El genotipado de HLA-C se realizó usando el procedimiento de PCR-SSOP. El ADN genómico se amplificó por PCR usando los cebadores genéricos para HLA-C descritos por Cereb N, Maye P, Lee S, Yang SY. Locus specific amplification of HLA class I genes from genomic DNA: locus specific sequences in the first and third introns of HLA-A, -B, y -C alleles. Tissue Antigens 1995;45:1-11, Tabla 2. Cada 100 µl de reacción contuvo 0,1 µg de ADN, 10 µl de 10 x tampón de reacción, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, 0,2 µM de cada cebador y 2 U de *Taq* ADN polimerasa (Bioline, Irlanda). Los productos amplificados (937 pb) se confirmaron por electroforesis en 1,5% de gel de agarosa.
- 10 Se usó una versión modificada del procedimiento de tipado de HLA-C para definir los grupos HLA-C1 y C2 usando la sonda C293 y C291, respectivamente (véase la Tabla 3).

Análisis estadístico

Las frecuencias de genes se compararon por recuento directo y se analizaron por prueba exacta de SPSS-Fisher. Se usó una prueba de la *t* independiente de Student para comparar las medias de las puntuaciones DAS28.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se describen en este documento de manera que se provea a aquellos expertos en la materia de una divulgación y descripción completa de la invención, y pretenden ser puramente a modo de ejemplo de la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de la invención.

5 Ejemplo 1. Genotipos

La frecuencia de cada gen *KIR* llevado en la población con AR se comparó con una población de control para buscar cualquier asociación de genotipos de *KIR* con AR. Las frecuencias se comparan en la Tabla 4. *KIR2DL2* y *KIR2DS2* fueron llevados con una mayor frecuencia en la población con AR en comparación con los controles (51,4% frente a 40,0%), aunque ésta no fue estadísticamente significativa (ES). En general, la población con AR mostró poca variación en la frecuencia para cada *KIR* en comparación con controles sanos, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.

Tabla 4. Frecuencias de contenido de genes *KIR* comparadas en pacientes con artritis reumatoide (AR) y controles sanos

Gen <i>KIR</i>	Frecuencia (%)	
	AR	Control
	(n = 70)	(n = 100)
2DS2	51,4	40,0
2DL2	51,4	40,0
2DL3	94,3	90,0
2DL1	97,1	98,0
3DL1	92,9	94,0
3DS1	37,1	41,0
2DL5	51,4	48,0
2DS3	24,3	23,0
2DS5	28,6	36,0
2DS1	37,1	41,0
2DS4	98,6	94,0
3DL3	100,0	100,0
2DL4	100,0	100,0
3DL2	100,0	100,0

15 Ejemplo 2. Genotipos identificados en la población con AR y sus frecuencias se comparan con aquellos de controles sanos.

Un resumen de los genotipos de *KIR* y haplotipos asignados en 70 pacientes con AR se muestra en la Tabla 5. Los genes *KIR* se disponen a medida que se producen en el locus de *KIR* de posiciones centroméricas a telómeras (de izquierda a derecha en la Tabla 5) anclados en *KIR2DL4*. Una caja rellena indica la presencia de un gen, una caja vacía representa su ausencia. Los genotipos se disponen en el orden de prevalencia decreciente (n) y sus frecuencias se comparan con datos de control sanos.

Tabla 5. Genotipos de KIR en pacientes con artritis reumatoide (AR)

Haplotipo	KIR																n	% de frecuencia	
	3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DP1	2DL1	3DP1	2DL4	3DL1	3DS1	2DL5	2DS3	2DS5	2DS1	2DS4	3DL2		AR (n= 70)	Control (n = 100)
1	AA																19	27,1	40,0
2	AB																11	15,7	11,0
3																	9	12,9	16,0
4																	8	11,4	4,0
5																	4	5,7	3,0
6																	2	2,9	4,0
7																	2	2,9	4,0
8																	2	2,9	1,0
9																	1	1,4	1,0
10																	1	1,4	-
11																	1	1,4	-
12																	1	1,4	-
13																	1	1,4	-
14																	1	1,4	-
15																	1	1,4	-
16																	1	1,4	-
17																	1	1,4	-
18																	1	1,4	-
19																	1	1,4	-
20																	1	1,4	-
21	BB																1	1,4	2,0

El genotipo más común consistió en KIR2DL3, KIR2DP1, KIR2DL1, KIR3DL1 y KIR2DS4 con genes de la región estructural KIR2DL4, KIR3DL2, KIR3DL3 y KIR3DP1 (27,1% de AR frente a 40,0% de controles; $P = ES$). Este genotipo se corresponde con homocigosidad para el haplotipo AA que lleva un KIR activador, KIR2DS4. En 11 de 70 pacientes y 11 de 100 controles se observó el genotipo KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DP1, KIR2DL1, KIR3DL1 y KIR2DS4 (15,7% de AR frente a 11,0% de controles; $P = ES$). El genotipo KIR2DL3, KIR2DP1, KIR2DL1, KIR3DL1, KIR3DS1, KIR2DL5, KIR2DS5, KIR2DS1, KIR2DS4 se observó en 9 de 70 pacientes y 16 de 100 controles (12,9% de AR frente a 16,0% de controles; $P = ES$). Un cuarto genotipo, compuesto por KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DP1, KIR2DL1, KIR3DL1, KIR2DL5, KIR2DS3 y KIR2DS4, fue llevado por el 11,4% de los pacientes y el 4,0% de los controles ($P = ES$). En total se encontraron 21 genotipos diferentes en la población con AR, en comparación con 19 en los controles. En el grupo de AR, 8 de los 21 genotipos estuvieron representados más de una vez y se explicaron el 81,4% de todos los pacientes genotipados. Esto es significativamente diferente de la población de control en la que 12 de los 19 genotipos estuvieron representados más de una vez incorporando el 93,0% de las muestras de control (81,4% de AR frente a 93,0% de controles; $P = 0,029$). Por tanto, hubo más genotipos distintos observados en la población con AR que los esperados.

Ejemplo 3. Haplotipos

Los genotipos del grupo de AR se dispusieron en los tres haplotipos AA, AB y BB principales según su contenido de genes, y en comparación con controles (Figura 5). En la población con AR, el haplotipo AA estuvo presente con una frecuencia del 27,1%, AB; 71,4% y BB; 1,4%. La frecuencia de los haplotipos AA y BB en los pacientes con AR no

fue significativamente diferente en comparación con controles (40,0% y 6,0%, respectivamente). El haplotipo AB fue significativamente más frecuente en la población con AR (71,4% de AR frente a 54,0% de controles; $P = 0,029$). La prevalencia del haplotipo AB en la población con AR demuestra un aumento del transporte por vehículo de más de un KIR activador en la población de pacientes.

5 Ejemplo 4. HLA

Para determinar la relevancia funcional de llevar cualquier KIR dentro de un genotipo, su ligando de HLA putativo también debe considerarse. Los pacientes con AR se tiparon para grupos de HLA-C1 (ligando para KIR2DL2, KIR2DL3 y KIR2DS2) y HLA-C2 (ligando para KIR2DL1, KIR2DS1) y en comparación con controles. Actualmente es aceptado que cualquier KIR que carece de su ligando de HLA relacionado es esencialmente no funcional. Se comparó cada relación de KIR-HLA (con y sin el ligando respectivo) y no se observaron diferencias significativas entre la población de AR y de control, véase la Tabla 6. También se examinaron la interacción de combinaciones de KIR-HLA en situaciones que podían inferir la mayor parte de la activación o inhibición y se describen en la Tabla 6. En conjunto, este análisis indica una tendencia general hacia menos inhibición y más activación de células NK en la población con AR.

15 Tabla 6. Combinaciones de KIR y HLA-C en pacientes con artritis reumatoide (AR) y controles sanos

Los tipos del grupo 1 y grupo 2 de HLA-C se describen en la Tabla 6 como C1 y C2, respectivamente. En todos los casos, exceptuando aquellos homocigotos específicamente marcados (homo), los pacientes tuvieron al menos una copia del grupo de HLA-C.

KIR/HLA	Frecuencia (%)		Fenotipo asumido
	AR (n = 70)	Control (n=100)	
2DS2 con C1	48,5	38,0	Activador
2DS2 sin C1	2,9	2,0	No funcional
2DL2 con C1	47,1	38,0	Inhibidor
2DL2 sin C 1	4,3	2,0	No funcional
2DL3 con C1	87,2	77,0	Inhibidor
2DL3 sin C 1	7,1	13,0	No funcional
2DS1 con C2	24,3	20,0	Activador
2DS1 sin C2	12,8	21,0	No funcional
2DL1 con C2	58,5	52,0	Inhibidor
2DL1 sin C2	38,6	46,0	No funcional
2DL1 ⁺ 2DS1 ⁻ con C2	35,3	33,7	Inhibidor
2DL1 ⁺ 2DS1 ⁻ C2 homo	5,9	8,3	Inhibidor
2DL3 ⁺ 2DL2/S2 ⁻ con C	1 47,0	54,4	Inhibidor
2DL3 ⁺ 2DL2/S2 ⁻ C1 homo	19,7	25,6	Inhibidor (bajo)
2DS2 ⁺ 2DL2 ⁺	51,4	40,0	Activador
2SD2 ⁺ C1 homo	44,4	57,5	Activador

2DS1 + C2 homo

3,9

12,2

Activador

Ejemplo 5. Contenido de gen *KIR* individual

Se comparó el contenido de gen *KIR* de los grupos de pacientes que responden al tratamiento y pacientes que no responden al tratamiento para buscar cualquier asociación de genotipos de *KIR* con respuesta a terapia anti-TNF- α (Tabla 7). Se encontró que el 67,6% (23 de 34) de los pacientes que respondían a terapia llevaban KIR2DS2/2DL2 en su genotipo en comparación con precisamente el 33,3% (10 de 30) de pacientes que no respondían al tratamiento (67,6% de los pacientes que responden al tratamiento frente al 33,3% de los pacientes que no responden al tratamiento; $P = 0,01$). Por tanto, KIR2DS2/2DL2 está significativamente más frecuentemente asociado a pacientes que responden a terapia. Cuando se comparó con controles sanos, el genotipo positivo para KIR2DS2/2DL2 siguió siendo significativamente más frecuente en el grupo de pacientes que responden al tratamiento (67,6% de pacientes que responden al tratamiento frente al 40,0% de controles; $P = 0,009$).

Tabla 7. Contenido de gen *KIR* en pacientes que responden y pacientes que no responden a tratamiento anti-TNF- α . Los valores de P se derivan de la prueba estadística exacta de Fisher.

Pacientes que responden a genes (n = 34)	Pacientes que no responden al tratamiento (n = 30)	Razón de probabilidades	Valor de P
2DS2 23 (67,6%)	10 (33,3%)	4,18	0,012
2DL2 23 (67,6%)	10 (33,3%)	4,18	0,012
3DS1 10 (29,4%)	15 (50,0%)	0,42	0,125
2DS5 7 (20,6%)	11 (36,7%)	0,45	0,175
2DS1 10 (29,4%)	14 (46,6%)	0,48	0,199
3DL1 33 (97,0%)	27 (90,0%)	3,67	0,333
2DS3 11 (32,3%)	6 (20,0%)	1,91	0,396
2DL5 19 (55,9%)	16 (53,3%)	1,11	0,413
2DS4 34 (100,0%)	29 (96,7%)	N/a	0,469
2DL3 32 (94,1%)	29 (96,7%)	0,55	1
2DL1 33 (97,0%)	30 (100,0%)	N/a	1
3DL3 34 (100,0%)	30 (100,0%)	N/a	1
2DL4 34 (100,0%)	30 (100,0%)	N/a	1
3DL2 34 (100,0%)	30 (100,0%)	N/a	1

El examen de los genotipos de *KIR* de pacientes que responden al tratamiento y pacientes que no responden al tratamiento no reveló diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, es digno de mención que 7 de 8 pacientes con AR con haplotipo 4 fueran pacientes que respondían al tratamiento (Tabla 5). Este haplotipo también se observó más comúnmente en la población con AR cuando se comparó con controles, aunque no fue estadísticamente significativo. Además, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes que responden al tratamiento y pacientes que no responden al tratamiento en la distribución de haplotipos AA, AB y BB. Sin embargo, la prevalencia del haplotipo AB fue significativamente mayor en el grupo de pacientes que responden al tratamiento grupo (36 de 34) cuando se comparó con la población de control (54 de 100) (76,5% de pacientes que responden al tratamiento frente al 54% de controles; $P = 0,026$). Este hallazgo apoya un genotipo activador en pacientes que responden a terapia.

Ejemplo 6. Efecto de la cigosidad de HLA-C sobre la respuesta clínica

Para considerar el efecto adicional de la cigosidad de HLA-C, los pacientes se clasificaron en cuatro grupos similares a un modelo propuesto por Nelson GW, Martin MP, Gladman D, Wade J, Trowsdale J, Carrington M. Heterozygote advantage in autoimmune disease: Hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in Psoriatic arthritis. J Immunol 2004; 173:4273-6, oscilando de la mayor activación (grupo I) a la mayor inhibición (grupo IV) de células NK basándose en interacciones KIR-HLA. El modelo de Nelson

consideró la presencia/ausencia de tanto KIR2DS1 como KIR2DS2 con cigosidad de HLA-C. Sin embargo, como KIR2DS1 no fue informativo en este estudio, el modelo de Nelson se modificó para considerar sólo KIR2DS2 en la interpretación. Por tanto, el mayor genotipo activador, grupo I, incluyó pacientes que fueron positivos para KIR2DS2 y fueron homocigotos para HLA-C (C1/C1 o C2/C2). Los pacientes en el grupo II fueron positivos para KIR2DS2 y fueron heterocigotos para HLA-C (es decir, tuvieron ambos ligandos, C1/C2). El grupo III fue negativo para KIR2DS2 y homocigoto para HLA-C. Finalmente, el grupo IV del genotipo más inhibitorio fue negativo para KIR2DS2 y heterocigoto para HLA-C. Cuando se clasificaron de esta forma, la relación de pacientes que respondieron al tratamiento con respecto a pacientes que no respondieron al tratamiento se invirtió del grupo I al IV (Figura 1).

Una comparación por grupos del número de pacientes que responden al tratamiento y pacientes que no responden al tratamiento reveló una diferencia significativa entre el grupo I (13 pacientes que responden al tratamiento, 3 pacientes que no responden al tratamiento) y IV (5 pacientes que responden al tratamiento, 13 pacientes que no responden al tratamiento) ($P = 0,018$, ajustado para comparación múltiple usando la corrección de Bonferroni). Ninguna otra comparación por grupos reveló una diferencia significativa. La puntuación DAS28 en el nivel inicial y después de 3 meses de tratamiento se comparó entre los grupos para soportar adicionalmente clínicamente la relación genética de KIR2DS2 con respuesta a terapia. No hubo diferencia significativa entre los grupos con respecto a la puntuación DAS28 antes de la terapia. La mayoría de los pacientes en los grupos I a III experimentó una reducción significativa de la puntuación DAS28 después del tratamiento ($P = 0,001$ y $P = 0,001$ y $P = 0,011$, respectivamente), aunque no los pacientes en el grupo IV ($P = 0,161$). La Figura 2B resume las puntuaciones DAS28 en el nivel inicial, después de 3 meses de terapia y las mejoras de la puntuación en el grupo I y IV. La mejora de la puntuación DAS28 media para pacientes en el grupo I fue significativamente mayor que la del grupo IV ($P = 0,022$).

El examen inicial del contenido de gen *KIR* en pacientes reveló que el transporte por vehículo de tanto KIR2DS2 como KIR2DL2 está asociado a buena respuesta a terapia. KIR2DS2 y KIR2DL2 son conocidos por compartir desequilibrio de enlace positivo, y raramente se encuentra uno en un genotipo sin el otro. Asociaciones previas de KIR2DS2 en complicaciones vasculares de AR sugerirían que el transporte por vehículo de este gen es el de mayor interés clínico relevante. La inversión general de los números de pacientes que responden al tratamiento y pacientes que no responden al tratamiento que se mueve hacia los grupos I a IV también indica una función definitiva para la cigosidad de KIR2DS2 y HLA-C en respuesta a terapia. Este estudio muestra que un genotipo de KIR activador, que podría reducir el umbral de activación para subconjuntos de células NK y de linfocitos T, está asociado a un desenlace clínico positivo. Asociaciones previas de polimorfismos de citocinas inflamatorias tales como los alelos de TNF α -308G o -857T indicaron que una predisposición genética hacia una respuesta inmunitaria proinflamatoria puede asociarse a un mal desenlace de la terapia anti-TNF α . Sin embargo, la significancia funcional de estos SNP en AR sigue sin estar clara y el fuerte desequilibrio de enlace durante toda la región del MHC complica la asociación de estos estudios y estudios de regiones de HLA adicionales con respuesta a terapia. Es posible que KIR2DS2 esté simplemente en enlace con un 'gen de respuesta' real; sin embargo, las asociaciones funcionales documentadas de KIR2DS2 con AR indicarían una función definitiva para este gen en respuesta a terapia anti-TNF- α .

Ejemplo 7. Efecto de la cigosidad de HLA-C sobre el estado de enfermedad

La Figura 2A ilustra las puntuaciones DAS28 en el nivel inicial (NI) y 3 meses después de la terapia (+3) de pacientes en cada uno de los grupos I-IV. No hubo diferencia significativa entre los grupos con respecto a la puntuación DAS28 antes de la terapia. La mayoría de los pacientes en los grupos I a III experimentaron una reducción significativa de la puntuación DAS28 después del tratamiento ($P = 0,001$, $P = 0,001$ y $P = 0,011$, respectivamente), aunque no los pacientes en el grupo IV. La Figura 2B resume las puntuaciones DAS28 en el nivel inicial, 3 meses después de la terapia, y las mejoras en el grupo I y IV. La mejora de la puntuación DAS28 media para pacientes en el grupo I fue significativamente mayor que la del grupo IV ($P = 0,022$).

Estos resultados sugieren que existen subgrupos de pacientes caracterizados por distintos perfiles de genotipo que están asociados a una diferencia significativa de la respuesta a terapia anti-TNF α . En este estudio, las puntuaciones DAS28 iniciales de pacientes que respondieron al tratamiento fueron significativamente superiores a aquellas de pacientes que no respondieron al tratamiento, pero esto no podría atribuirse al transporte por vehículo de KIR2DS2. Las puntuaciones DAS28 iniciales para pacientes con y sin KIR2DS2 no fueron estadísticamente diferentes; sin embargo, la mejora de la puntuación fue significativamente mayor en el grupo de pacientes que llevaba este genotipo. Es posible que los pacientes que respondieron al tratamiento pudieran tener un mecanismo diferente de patogénesis de la enfermedad que los pacientes que no respondieron al tratamiento. La aparición de un perfil inhibitorio de células NK en pacientes que no respondieron al tratamiento es apoyada por su prevalencia en la cohorte del grupo IV propuesta que son negativos para KIR2DS2 y heterocigotos para HLA-C.

Ejemplo 8. El uso de 2DS2 como clasificador

Para evaluar si la respuesta de un paciente a tratamiento puede predecirse se usaron diversos clasificadores estadísticos y del aprendizaje de máquina, que incluyen análisis discriminante lineal de Fisher (LDA), árboles de decisión, redes neurales, mínimos cuadrados parciales y máquinas de vectores de soporte. El rendimiento de los modelos se comparó usando validación cruzada dejando uno fuera (LOOCV). De particular importancia es el gen KIR2DS2, que proporciona la mayor información para predecir la respuesta a terapia. Los pacientes que respondieron a tratamiento mostraron una frecuencia significativamente mayor de KIR2DS2 ($P = 0,012$). Usando

sólo este gen y la información de ligandos, además de las puntuaciones DAS28 de los pacientes antes del tratamiento, LDA alcanzó la mayor precisión validada cruzada de 44 de 64 predicciones correctas (precisión 0,69, intervalo de confianza del 95% [0,57-0,81]). Este clasificador produce una probabilidad posterior para la respuesta/no respuesta para cada paciente X, con $p(\text{paciente que responde al tratamiento} | X) = 1 - p(\text{paciente que no responde al tratamiento} | X)$. Un paciente X puede clasificarse como un paciente que responde al tratamiento si $p(\text{paciente que responde al tratamiento} | X) > p(\text{paciente que no responde al tratamiento} | X)$. Con referencia a la Figura 3, el área resultante bajo la curva de la característica operativa del receptor (ROC) común es $ABC = 0,73$ (IC del 95% [0,61-0,86]), que es un resultado significativo ($P = 0,001$).

Ejemplo 9. Modelo de soporte a decisiones

En un procedimiento de decisión clínica se desearía minimizar el número de casos no concluyentes mientras que, al mismo tiempo, se maximizara la confianza en aquellas decisiones clínicas que se toman. Usando análisis de ROC, $p = 0,65$ se identificó como un umbral óptimo: si se predice que un paciente responde con al menos 0,65 de probabilidad, entonces se toma una decisión clínica que responderá. Si se predice que un paciente responde con 0,35 de probabilidad o menos, entonces se toma una decisión clínica que no responderá. En todos los otros casos (por ejemplo, probabilidades en el intervalo 0,35-0,65) no se tomó decisión. Esta estrategia se resume en el modelo de soporte a decisiones representado en la Figura 4, que encapsula el clasificador discriminante lineal.

El modelo toma una información de entrada sobre un estado 2DS2 del paciente que incluye la información del ligando y la puntuación DAS28 antes del tratamiento. Para cada paciente, el clasificador encapsulado calcula la probabilidad posterior que responderá al tratamiento. Entonces, sólo se toma una decisión si este valor supera los valores umbral críticos. Usando esta estrategia, el modelo predice el desenlace de 48 (75%) pacientes y no toma decisión para 16 (25%). Para aquel 75% de pacientes para los que el modelo hace de hecho una predicción se observa una precisión global de 0,73, una sensibilidad de 0,72, una especificidad de 0,74, un valor predictivo positivo de 0,75 y un valor predictivo negativo de 0,71.

Particularmente se observa que hay 11 pacientes que responden al tratamiento del grupo I para los que el modelo toma una decisión, siendo todas correctas. Hay 11 pacientes que no responden al tratamiento en el grupo IV para los que el modelo toma una decisión; de nuevo, todas son correctas. Además, se observa que todas las predicciones hechas con confianza muy alta son correctas. Por ejemplo, esta cohorte contiene cuatro pacientes que responden al tratamiento y cuatro que no responden al tratamiento para los que se hace una predicción con más de 0,89 de probabilidad. Todas estas predicciones de alta confianza son correctas.

En resumen, este estudio demuestra una asociación positiva de cigosidad de KIR2DS2 y HLA-C con buena respuesta a terapia anti-TNF α . Se construyó un modelo de soporte a decisiones que puede tomar tres tipos de decisiones: (a) un paciente es un *paciente que responde al tratamiento* (con probabilidad $p \geq 0,65$) (b) un paciente es un *paciente que no responde al tratamiento* (con probabilidad $q = 1 - p \geq 0,65$), o (c) *respuesta desconocida* (con probabilidad para la respuesta $0,35 < p < 0,65$). Basándose en estas probabilidades, los pacientes pueden clasificarse y priorizarse para el tratamiento. El modelo de soporte a decisiones consigue alta sensibilidad y especificidad teniendo en cuenta las características genéticas individuales y podría representar una primera etapa hacia una medicina personalizada en enfermedades inflamatorias crónicas.

Esta herramienta predictiva encuentra una amplia utilidad clínica en la gestión de AR, y ayuda enormemente a los profesionales clínicos en la priorización de pacientes para terapia basada en TNF, reduciendo así significativamente el coste de tratamiento en términos de efectos secundarios adversos y presupuestos sanitarios.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de identificación de sujetos que probablemente responden a terapia basada en anti-factor de necrosis tumoral alfa, procedimiento que comprende las etapas de:
 - a. evaluar la presencia, ausencia o nivel cuantitativo de al menos un gen *KIR* seleccionado de *2DS2* y *2DL2* para un sujeto; o evaluar la presencia, ausencia o nivel cuantitativo de un producto de expresión codificado por el gen;
 - b. evaluar la presencia, ausencia o nivel cuantitativo de un gen que codifica un ligando KIR seleccionado del grupo 1 de HLA-C y el grupo 2 de HLA-C; o evaluar la presencia, ausencia o nivel cuantitativo de un producto de expresión codificado por el gen; y
 - c. estratificar el sujeto en base a la presencia, ausencia o nivel cuantitativo del al menos un gen *KIR* o en base a la presencia, ausencia o nivel cuantitativo de un producto de expresión codificado por el gen; y la presencia, ausencia o nivel cuantitativo del gen que codifica el ligando KIR o en base a la presencia, ausencia o nivel cuantitativo de un producto de expresión codificado por ese gen.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la presencia, ausencia o nivel cuantitativo del al menos un gen *KIR* se evalúa evaluando la presencia, ausencia o nivel cuantitativo del producto de expresión del al menos un gen *KIR*.
3. Un procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la presencia, ausencia o nivel cuantitativo del gen que codifica un ligando KIR se evalúa evaluando la presencia, ausencia o nivel cuantitativo del producto de expresión del gen que codifica el ligando KIR.
4. Un procedimiento según la reivindicación 2, en el que el producto de expresión es un polipéptido codificado por el al menos un gen *KIR*.
5. Un procedimiento según la reivindicación 3, en el que el producto de expresión es un polipéptido codificado por el gen que codifica el ligando KIR.
6. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que la terapia en base a anti-factor de necrosis tumoral alfa es una intervención terapéutica que elige como diana la señalización del factor de necrosis tumoral alfa.
7. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que el al menos un gen *KIR* es *2DS2*, y en el que el ligando KIR es el grupo 1 de HLA-C.
8. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende además la etapa de determinar el haplotipo del sujeto.
9. Un procedimiento según la reivindicación 8, en el que la presencia de un haplotipo del grupo B es indicativo de que un sujeto responderá (es un paciente que responde al tratamiento).
10. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que la presencia de al menos una copia de *2DS2* y homocigosidad del grupo 1 de HLA-C (C1/C1) es indicativo de que un sujeto responderá (es un paciente que responde al tratamiento).
11. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que la presencia de al menos una copia de *2DS2* y homocigosidad del grupo 2 de HLA-C (C2/C2) es indicativo de que un sujeto responderá (es un paciente que responde al tratamiento).
12. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que el procedimiento comprende además la etapa de evaluar la puntuación DAS28 del sujeto.
13. Uso de al menos un gen *receptor similar a inmunoglobulina de células asesinas* seleccionado de *2DS2* y *2DL2* y un gen que codifica un ligando KIR seleccionado de grupo 1 de HLA-C y el grupo 2 de HLA-C para la identificación de sujetos que probablemente responden a terapia basada en anti-factor de necrosis tumoral.

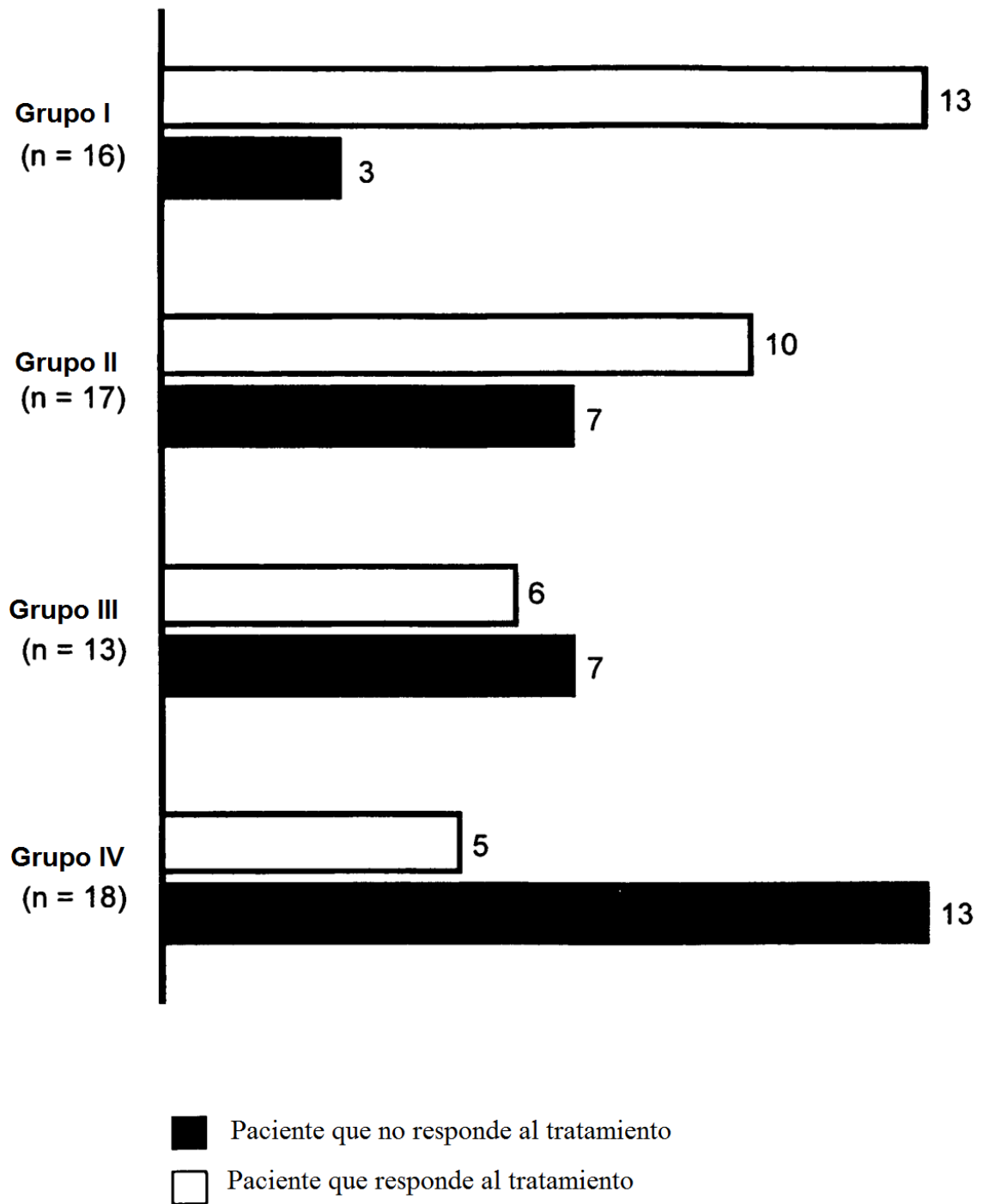
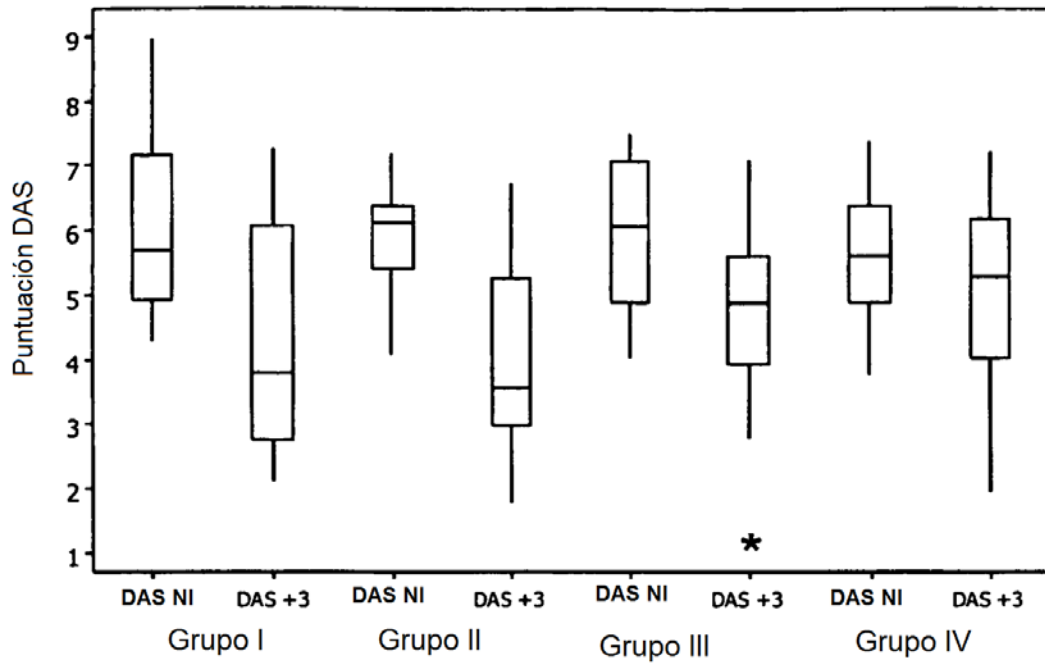


Figura 1

A.



B.

	Grupo I (2DS2+ HLA-C homo)	Grupo IV (2DS2- HLA-C hetero)	Valor de p de diferencia
DAS28 en el nivel inicial	6,05 (intervalo, 4,28-8,96)	5,64 (intervalo, 3,75-7,38)	0,324
DAS28 después de 3 meses	4,25 (intervalo, 2,11-7,27)	5,16 (intervalo, 1,95-7,22)	0,104
Mejora de DAS	1,80 (intervalo,-1,85-3,92)	0,48 (intervalo, -2,25-3,32)	0,022
Nº de pacientes que responden al tratamiento/pacientes que no responden al tratamiento	13/3	5/13	0,003
Valor de P de mejora	0,001	0,161	

Figura 2

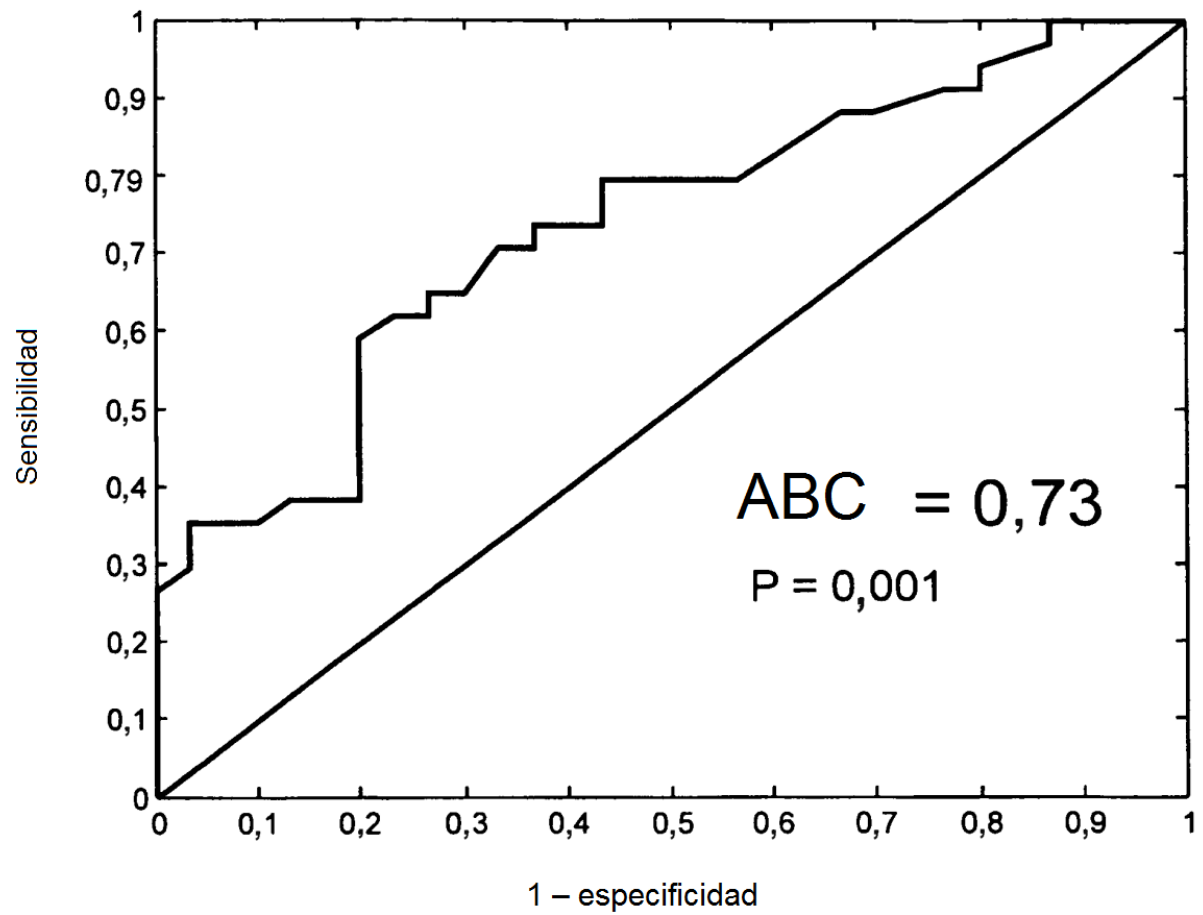


Figura 3

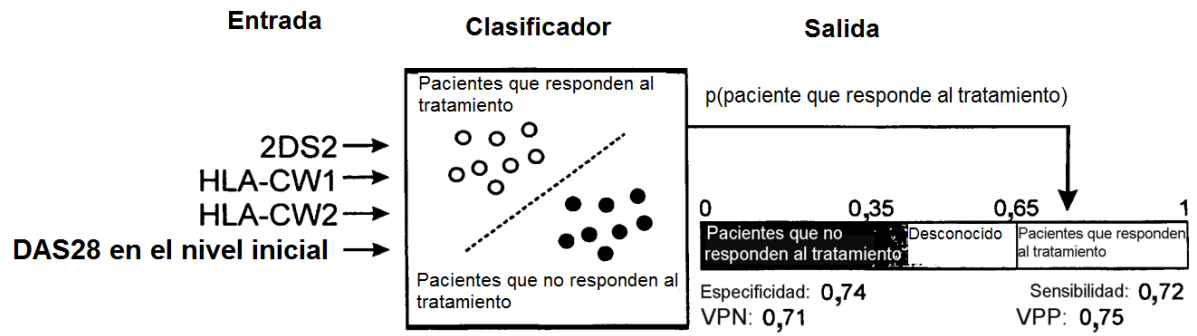


Figura 4

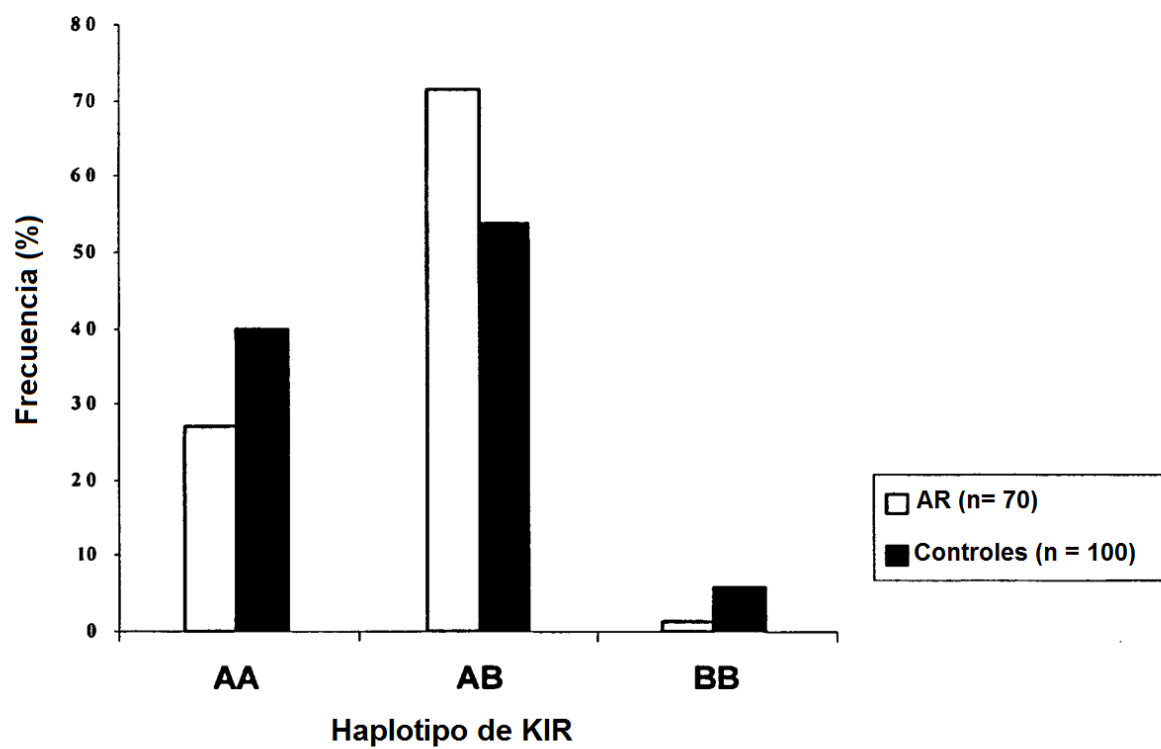


Figura 5