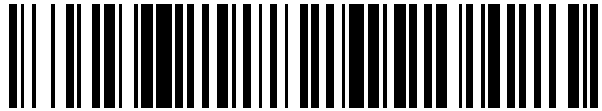


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 406 000**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2005 E 05762644 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013 EP 1776472**

54 Título: **Métodos para predecir los niveles de poliglutamato de metotrexato utilizando farmacogenética**

30 Prioridad:

15.06.2004 US 580141 P
13.06.2005 US 152128

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.06.2013

73 Titular/es:

NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey , CH

72 Inventor/es:

DERVIEUX, THIERRY

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 406 000 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

Métodos para predecir los niveles de poliglutamato de metotrexato utilizando farmacogenética

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El folato (ácido fólico) es una vitamina que resulta esencial para los procesos de sostén de la vida, de síntesis, replicación y reparación del ADN. El folato también resulta importante para la biosíntesis de proteínas, otro proceso crucial para la viabilidad celular. El compuesto pteridina llamado metotrexato (MTX) es estructuralmente similar al folato y en consecuencia puede unirse a los sitios activos de varios enzimas que normalmente utilizan el folato como coenzima para la biosíntesis de precursores de nucleótidos purina y pirimidina del ADN y para la interconversión de aminoácidos durante la biosíntesis de proteínas. A pesar de su similitud estructural con el ácido fólico, el metotrexato no puede ser utilizado como cofactor por enzimas que requieren folato, y en su lugar compite con el cofactor folato para los sitios de unión del enzima, inhibiendo de esta manera la biosíntesis de proteínas y ADN y, por lo tanto, la división celular.

15 La capacidad del antagonista del folato llamado metotrexato de inhibir la división celular ha sido aprovechado en el tratamiento de algunas enfermedades y condiciones que se caracterizan por el crecimiento celular rápido o aberrante. Por ejemplo, el metotrexato es actualmente uno de los fármacos más ampliamente prescritos para el tratamiento de la artritis reumatoide, la soriasis y el cáncer (Weinblatt *et al.*, Eng. J. Med. 312:818-822, 1985; Kremer y Lee, Arthritis Rheum. 29:822-831, 1986). Aunque el metotrexato es de los fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad mejor tolerados, una desventaja importante de la terapia de metotrexato es una problemática variabilidad entre pacientes en la respuesta clínica y la aparición impredecible de efectos secundarios, incluyendo alteraciones gastrointestinales, alopecia, elevación de los enzimas hepáticos y supresión de la médula ósea (Weinblatt *et al.*, Arthritis Rheum. 37:1492-1498, 1994; Walker *et al.*, Arthritis Rheum. 36:329-335, 1993). Varios estudios en ensayos clínicos bien controlados han demostrado que el metotrexato resulta efectivo para reducir la discapacidad funcional, produciéndose el efecto máximo tras aproximadamente seis meses de terapia. Sin embargo, resultados recientes de estudios retrospectivos en una cohorte de gran tamaño de pacientes con artritis reumatoide sugieren que la dosificación de metotrexato podría ser subóptima en algunos pacientes (Ortendahl *et al.*, J. Rheumatol. 29:2084-2091, 2002). De esta manera, la falta de un seguimiento eficiente del fármaco terapéutico en la terapia con metotrexato y la dificultad para individualizar rápidamente la respuesta maximizadora de la dosis de metotrexato dificulta el tratamiento efectivo del paciente.

35 El metotrexato entra en las células mediante el portador de folato reducido (RFC-1), cuyo símbolo reconocido es SLC19A1, y resulta activado intracelularmente por la folilpoliglutamato sintasa formando poliglutamatos de metotrexato (MTXPG) (Chabner *et al.*, J. Clin. Invest. 76:907-912, 1985). La adición secuencial en enlace y de residuos de ácido glutámico incrementa la retención intracelular del metotrexato (Allegra *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4881-4885, 1985). El proceso de poliglutamación compite con la desconjugación por parte de la γ -glutamihidrolasa (GGH) (Rhee *et al.*, Mol. Pharmacol. 53:1040-1046, 1998; Yao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:10134-10138, 1996; Panetta *et al.*, Clin. Cancer Res. 8:2423-2429, 2002), un enzima lisosómico que presenta una elevada afinidad para los poliglutamatos de cadena larga (Masson *et al.*, J. Clin. Invest. 97: 73-80, 1996).

45 La acumulación de MTXPG resulta crítica para los efectos farmacológicos del metotrexato. *In vivo*, la concentración de MTXPG en los linfoblastos y eritrocitos aparentemente se correlaciona con la respuesta terapéutica al metotrexato en pacientes con leucemia (Dervieux *et al.*, Blood 100:1240-1247, 2002; Dervieux *et al.*, Arthritis Rheum., en prensa, 2004) o con artritis reumatoide (Angelis-Stoforidis *et al.*, Clin. Exp. Rheumatol. 17:313-320, 1999; Allegra *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4881-4885, 1985). La poliglutamación del metotrexato se cree que estimula una inhibición sostenida de la síntesis *de novo* de purinas por parte de la 5-aminoimidazol-carboxamida ribonucleótido transformilasa (ATIC) (Dervieux *et al.*, Blood 100:1240-1247, 2002; Allegra *et al.*, supra, 1985), estimulando de esta manera la acumulación de adenosina, un potente agente antiinflamatorio (Baggott *et al.*, Biochem. J. 236:193-200, 1986; Morabito *et al.*, J. Clin. Invest. 101:295-300, 1998; Montesinos *et al.*, Arthritis 48:240-247, 2003; Cronstein *et al.*, J. Clin. Invest. 92:2675-2682, 1993). Además, los MTXPG son inhibidores de la timidilato sintasa (TS) (Allegra *et al.*, J. Biol. Chem. 260:9720-9726, 1985). La TS metila el monofosfato de desoxitimidina, produciendo desoxitimidilato, proporcionando una fuente *de novo* única de timidilato.

55 Parte de la gran variabilidad entre individuos en respuesta al metotrexato se relaciona con polimorfismos comunes en genes que participan en la farmacocinética o farmacodinámica del metotrexato (Rolling y Dervieux, Nat. Rev. Cancer 1:99-108, 2001). Recientemente, se ha identificado una transición G a A en el exón 1 (posición 80) de RFC-1, que resulta en una sustitución de arginina por histidina en el codón 27 (Chango *et al.*, Mol. Genet. Metab. 70:310-315, 2000). Sin embargo, la consecuencia funcional de este polimorfismo sobre el transporte del metotrexato sigue sin estar clara (Whetstone *et al.*, Clin. Cancer Res. 7:3416-3422, 2001; Laverdiere *et al.*, Blood 100:3832-3834, 2002). Además, un estudio reciente de niños con leucemia linfoblástica aguda ha sugerido que la variante A podría estar asociada a malos resultados clínicos en comparación con los pacientes que presentan el genotipo G/G; los

individuos que portan el genotipo A/A presentaban concentraciones plasmática más altas de metotrexato que aquellos con los genotipos G/G o G/A (Laverdiere *et al.*, supra, 2002).

5 Debido a que las diferencias individuales en los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos pueden resultar difíciles de predecir y debido a que el genotipo del paciente afecta a estos parámetros, podría incrementarse la seguridad y efectividad del tratamiento con metotrexato mediante el genotipado del paciente. De esta manera, existe una necesidad de nuevas correlaciones entre genotipos del paciente y eficacia de la terapia de metotrexato. También existe una necesidad de nuevos métodos para determinar u optimizar la eficacia de la terapia de metotrexato mediante la determinación de los niveles de MTXPG en un paciente mediante genotipado. La presente invención satisface estas necesidades y también proporciona ventajas relacionadas.

BREVE DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

15 La presente invención proporciona métodos para determinar la eficacia de la terapia con MTX en un individuo sometido a terapia según se define en la reivindicación 1.

El método predice el nivel de poliglutamatos de metotrexato (MTXPG) en un individuo sometido a terapia de metotrexato.

20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra las estructuras del metotrexato y de los poliglutamatos de metotrexato. Figura 1A: estructura química del metotrexato. Figura 1B: estructura química de los poliglutamatos de metotrexato, en la que N se refiere al número de glutamatos unidos al metotrexato.

25 La figura 2 muestra un gráfico de dispersión de las concentraciones predichas versus observadas de MTXPG. Se predijeron las concentraciones de MTXPG utilizando un análisis de regresión lineal multivariante que incluía edad, vía de administración, dosis semanal de MTX y genotipos *RFC-1* y *GGH* según la ecuación multivariante de la Tabla 2. Figura 2A: gráfico de dispersión de concentraciones predichas versus observadas de MTXPG₁₋₅. Figura 2B: gráfico de dispersión de concentraciones predichas versus observadas de MTXPG₃₋₅.

30 La figura 3 muestra el efecto del índice farmacogenético (IF) sobre las concentraciones de MTXPG. Se calculó el IF como la presencia del genotipo *RFC-1* 180A/A menos la presencia del genotipo *GGH*-401T/T (ver el Ejemplo 1). Figura 3A: Se asoció un IF incrementado, por ejemplo de -1 a 1, a niveles más altos de MTXPG₁₋₅ (p=0,057) y a niveles más altos de MTXPG₃₋₅ (p=0,027). Figura 3B: Un IF incrementado, por ejemplo de -1 a 1, se asoció a niveles más altos de MTXPG₅ (p=0,0006) y a niveles más altos de MTXPG₄ (p=0,027).

35 La figura 4 muestra el efecto del índice farmacogenético (IF) sobre la probabilidad de un individuo de presentar niveles de MTXPG₃₋₅ superiores a la mediana. La ecuación para la determinación de la probabilidad era la siguiente: MTXPG₃₋₅ superior a la mediana (0/1) = (-0,24 ± 0,13) + (1,04 ± 0,29 x IF). Las probabilidades se proporcionan con barras de error estándar.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 I. Definiciones

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos y expresiones siguientes presentan los significados atribuidos a los mismos, a menos que se indique lo contrario.

50 El término "metotrexato" es sinónimo de "MTX" y se refiere a una molécula que presenta la estructura mostrada en la figura 1A. El metotrexato incluye, en parte, una fracción de anillo pterina 2,4-diamino-sustituida, unida en la posición 6 al grupo amino de una fracción p-aminobenzoilo, presentando la fracción p-aminobenzoilo un grupo amino metilado y encontrándose unida mediante amida a una fracción ácido glutámico. Tal como se utiliza en la presente memoria, "MTXPG₁" es sinónimo de metotrexato.

55 La expresión "poliglutamato de metotrexato" es sinónima de "MTXPG" y se refiere a un derivado de metotrexato que presenta dos o más glutamatos que se encuentran unidos mediante amida a la fracción p-aminobenzoilo del metotrexato, tal como se muestra en la estructura generalizada de la figura 1B. El número de glutamatos en un poliglutamato de metotrexato varía de dos a siete o más; el número de fracciones glutamato puede indicarse como "n" utilizando la nomenclatura MTXPG_n, de manera que, por ejemplo, MTXPG₂ es MTXPG que presenta dos glutamatos, MTXPG₃ es MTXPG que presenta tres glutamatos, MTXPG₄ es MTXPG que presenta cuatro glutamatos, MTXPG₅ es MTXPG que presenta cinco glutamatos, MTXPG₆ es MTXPG que presenta seis glutamatos, MTXPG₇ es MTXPG que presenta siete glutamatos, y MTXPG₃₋₅ es una mezcla que contiene MTXPG₃, MTXPG₄ y

MTXPG₅, no estando definida la proporción de las formas poliglutamadas individuales en la mezcla.

5 La expresión "terapia de metotrexato" o "terapia de MTX" se refiere al tratamiento de cualquiera de entre una diversidad de enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias y cánceres utilizando metotrexato o un análogo del mismo. Un "análogo de metotrexato" es un compuesto que presenta una similitud estructural y funcional con el metotrexato, e incluye, aunque sin limitación, derivados 4-amino con sustitución de halógeno en la fracción para-aminobenzoico, tal como diclorometotrexato, MTX 7-metil-sustituido, 3',5'-difluoro-MTX, derivados 2' y 3' monofluorados de aminopterina y 7,8-dihidro-8-metil-MTX. El experto en la materia apreciará que la expresión 10 terapia de metotrexato incluye otros compuestos antifolato, tales como aminopterina, raltitrexed, lometrexol, antifolato multidiana (MTA), AQA, edetrexato, lometrexol, BW1843U89, ZD1694 y análogos de los mismos. El experto en la materia apreciará además que el metotrexato puede utilizarse en una terapia de combinación con uno o más análogos de metotrexato y/o con otros compuestos antifolato.

15 La expresión "enfermedad inflamatoria" se refiere a una enfermedad o trastorno caracterizado o causado por inflamación. El término "inflamación" se refiere a una respuesta local al daño celular marcada por dilatación capilar, infiltración leucocítica, rojez, calor y dolor, que sirve como mecanismo que inicia la eliminación de agentes perjudiciales y de tejido dañado. El sitio de inflamación incluye los pulmones, la pleura, tendones, nódulos o glándulas linfáticas, la úvula, la vagina, el cerebro, la médula espinal, las membranas mucosas nasal y faríngea, músculos, piel, hueso o tejido óseo, articulaciones, la vejiga urinaria, la retina, el cérvix del útero, el canto, el tracto 20 intestinal, las vértebras, el recto, el ano, la bursa, folículos y similares. Entre dichas enfermedades inflamatorias se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las enfermedades intestinales inflamatorias, las enfermedades reumatoideas (por ejemplo la artritis reumatoide), otras enfermedades artríticas (por ejemplo la artritis aguda, la artritis gotosa aguda, la artritis bacteriana, la artritis inflamatoria crónica, la artritis degenerativa (osteoartritis), la artritis infecciosa, la artritis juvenil, la artritis micótica, la artritis neuropática, la poliartritis, la artritis proliferativa, la artritis sorbiática, la artritis venérea y la artritis vírica), la fibrositis, la enfermedad inflamatoria pélvica, el acné, la soriasis, la actinomicosis, la disentería, la cirrosis biliar, la enfermedad de Lyme, la fiebre miliaria, el síndrome de Stevens-Johnson, la parotiditis, el pénfigo vulgar y la blastomicosis. Las enfermedades intestinales inflamatorias son enfermedades inflamatorias crónicas del tracto gastrointestinal, entre las que se incluyen, aunque sin limitarse a 25 ellas, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y la colitis indeterminada. La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria crónica principalmente de las articulaciones, habitualmente poliarticular, marcada por cambios inflamatorios en las membranas sinoviales y estructuras articulares y por la atrofia muscular y la rarefacción de los huesos.

35 La expresión "enfermedad autoinmunitaria" se refiere a una enfermedad o trastorno que resulta de una respuesta inmunitaria contra un tejido propio o componente de tejido e incluye una respuesta de autoanticuerpos o una respuesta mediada por células. La expresión enfermedad autoinmunitaria, tal como se utiliza en la presente memoria, comprende enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano, en las que se dirige una respuesta autoinmunitaria contra un único tejido, tal como la diabetes mellitus de tipo I, la miastenia grave, el vitiligo, la enfermedad de Graves, la enfermedad de Hashimoto, la enfermedad de Addison, la gastritis autoinmunitaria y la hepatitis autoinmunitaria. La expresión enfermedad autoinmunitaria también comprende enfermedades autoinmunitarias no específicas de órgano, en las que se dirige una respuesta autoinmunitaria contra un componente presente en varios órganos o en muchos órganos en todo el cuerpo. Entre dichas enfermedades autoinmunitarias se incluyen, por ejemplo, el lupus eritematoso sistémico, la esclerosis sistémica progresiva y variantes, la polimiositis y la denatomiocitis. Entre las enfermedades autoinmunitarias adicionales se incluyen, 40 aunque sin limitarse a ellas, la anemia perniciosa, la cirrosis biliar primaria, la trombocitopenia autoinmunitaria, el síndrome de Sjögren y la esclerosis múltiple.

50 El término "cáncer" se refiere a cualquiera de entre diversos neoplasmas malignos, caracterizado por la proliferación de células anaplásicas que tienden a invadir el tejido circundante y metastizar a nuevos sitios del cuerpo. Entre los ejemplos de tipos diferentes de cáncer se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de tiroides, cáncer hepático, cáncer pleural, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer cervical, cáncer testicular, cáncer de colon, cáncer anal, cáncer de los conductos biliares, tumores carcinoides gastrointestinales, cáncer esofágico, cáncer de la vesícula biliar, cáncer rectal, cáncer del apéndice, cáncer del intestino delgado, cáncer de estómago (gástrico), cáncer renal, cáncer del sistema nervioso central, cáncer de piel, coriocarcinomas, cánceres de cabeza y cuello, cánceres hematológicos, sarcomas osteogénicos, linfoma de células 55 B, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Burkitt, fibrosarcoma, neuroblastoma, glioma, melanoma, leucemia monocítica, leucemia mielógena, leucemia linfocítica aguda y leucemia mielocítica aguda.

60 El término "gen" se refiere al segmento de ADN que participa en la producción de una cadena polipeptídica; incluye regiones anteriores y posteriores a la región codificante, tales como el promotor y la región 3' no traducida, respectivamente, así como secuencias intermedias (intrones) entre los segmentos codificantes individuales (exones).

La expresión "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y a polímeros

de los mismos, en forma de cadena sencilla o de doble cadena, incluyendo, por ejemplo, ADN genómico, ADNc y ARNm. Dicha expresión comprende las moléculas de ácidos nucleicos de origen tanto natural como sintético, así como las moléculas de configuración lineal, circular o ramificada que representan la cadena de sentido o antisentido, o ambas, de una molécula nativa de ácidos nucleicos. Se entiende que dichos ácidos nucleicos puede encontrarse en estado no purificado, purificado o ligado, por ejemplo a un material sintético, tal como una matriz de perla o columna. La expresión comprende además los ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que presentan propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y son metabolizados de una manera similar a los nucleótidos naturales. A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácidos nucleicos también comprende implícitamente las variantes modificadas conservadoramente de los mismos (por ejemplo sustituciones de codones degenerados), polimorfismos, alelos, ortólogos, polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. La expresión ácido nucleico se utiliza intercambiamente en la presente memoria con gen, ADNc y ARNm codificado por un gen.

El término "polimorfismo" se refiere a la incidencia de dos o más secuencias o alelos alternativos genéticamente determinados en una población. Un "sitio polimórfico" se refiere al locus en el que se produce la divergencia. Los sitios polimórficos preferentes presentan por lo menos dos alelos, encontrándose cada uno a una frecuencia particular en una población. Un locus polimórfico puede ser de tan sólo un par de bases (es decir, un polimorfismo de un único nucleótido, o SNP). Entre los marcadores polimórficos se incluyen los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, número variable de repeticiones en tándem (VNTR), regiones hipervariables, minisatélites, repeticiones de dinucleótido, repeticiones de trinucleótido, repeticiones de tetranucleótido, repeticiones de secuencias simples y elementos de inserción tales como Alu. El primer alelo identificado se denomina arbitrariamente alelo de referencia, y los demás alelos se denominan alelos alternativos, "alelos variantes" o "variantes". Los alelos más frecuentes en una población seleccionada en ocasiones se denominan alelos "de tipo salvaje". Los organismos diploides pueden ser homocigóticos o heterocigóticos para los alelos variantes. El alelo variante puede producir o no una característica física o bioquímica observable ("fenotipo") en un individuo que porte el alelo variante. Por ejemplo, un alelo variante puede alterar la actividad enzimática de una proteína codificada por un gen de interés.

Un "polimorfismo de un único nucleótido" o "SNP" se produce en un sitio polimórfico ocupado por un único nucleótido, el cual es el sitio de variación entre secuencias alélicas. Antes y después del sitio habitualmente se encuentran secuencias altamente conservadas del alelo (por ejemplo secuencias que varían en menos de 1/100 ó 1/1.000 de los miembros de las poblaciones). Un SNP habitualmente surge debido a la sustitución de un nucleótido por otro en el sitio polimórfico. Una transición es la sustitución de una purina por otra purina o de una pirimidina por otra pirimidina. Una transversión es la sustitución de una purina por una pirimidina o viceversa. Los polimorfismos de nucleótidos únicos también pueden surgir a partir de una delección de un nucleótido o de una inserción de un nucleótido respecto a un alelo de referencia.

El término "genotipo" se refiere a la composición genética de un organismo, incluyendo, por ejemplo, si un organismo diploide es heterocigótico u homocigótico para uno o más alelos variantes de interés.

Un "gen de la ruta del folato" se refiere a cualquier gen implicado en la homeostasis y/o metabolismo del folato e incluye las proteínas codificadas por estos genes. Entre los ejemplos de genes de la ruta del folato se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el portador de folato reducido (*RFC-1*), γ -glutamyl-hidrolasa (*GGH*), folilpoliglutamato sintasa (*FPGS*), 5,10-metilén-tetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*), 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido transformilasa (*ATIC*), timidilato sintasa (*TS*), serina-hidroximetiltransferasa (*SHMT*), dihidrofolato reductasa (*DHFR*), 10-formiltetrahidrofolato sintetasa (*FTHFS*), 10-formiltetrahidrofolato deshidrogenasa (*FTHFD*), glicinamida ribonucleótido transformilasa (*GART*), aldehído oxidasa, transportadores de entrada/salida, tales como las proteínas de resistencia a múltiples fármacos (por ejemplo *MRP2*) y combinaciones de los mismos. Preferentemente, el gen de la ruta del folato es *RFC-1* y/o *GGH*.

Se calcula un "índice farmacogenético" o "IF" para determinar un nivel de MTXPG en un individuo sometido a terapia con MTX o para optimizar la eficacia de dosis de la terapia con MTX en un individuo. Se da a conocer una diversidad de métodos o algoritmos para calcular diversos índices farmacogenéticos. El índice farmacogenético puede calcularse como la suma o la diferencia entre el número de alelos variantes en uno o más sitios polimórficos. Por ejemplo, en el caso de que un individuo sea heterocigótico para un alelo variante en un sitio polimórfico, el alelo variante contribuye un valor de 1 al índice farmacogenético. De manera similar, en el caso de que un individuo sea homocigótico para un alelo variante en un sitio polimórfico, los alelos variantes contribuye un valor de 2 al índice farmacogenético. En el caso de que un individuo sea de tipo salvaje en un sitio polimórfico, no existe ninguna contribución del alelo variante al índice farmacogenético.

El índice farmacogenético puede calcularse como la suma o la diferencia entre el número de alelos variantes homocigóticos en uno o más sitios polimórficos. Por ejemplo, un individuo que sea homocigótico para un alelo variante (es decir, que presente 2 copias del alelo variante) contribuye un valor de 1 al índice farmacogenético. En el

caso de que un individuo sea de tipo salvaje en un sitio polimórfico, no existe ninguna contribución del alelo variante al índice farmacogenético. Preferentemente, el índice farmacogenético se calcula como la diferencia entre el número de alelos variantes homocigóticos en uno o más sitios polimórficos en, por ejemplo, el gen *RFC-1* y el gen *GGH*. De esta manera, en determinados casos puede calcularse un índice farmacogenético para determinar los niveles de MTXPG en un individuo de la manera siguiente:

(1) se asigna un valor de 1 al gen *RFC-1* en el caso de que se encuentre presente un genotipo homocigótico 80A/A de *RFC-1*, o un valor de 0 en el caso de que se encuentre presente un genotipo de tipo salvaje 80G/G de *RFC-1* ó heterocigótico 80G/A; (2) se asigna un valor de 1 al gen *GGH* en el caso de que se encuentre presente un genotipo homocigótico de *GGH-401T/T* o un valor de 0 en el caso de que se encuentre presente un genotipo de tipo salvaje, *GGH-401C/C* o heterocigótico, *GGH-401C/T*, y (3) se resta el valor asignado al gen *GGH* del valor asignado al gen *RFC-1* (es decir, valor de *RFC-1* - valor de *GGH*).

La presente invención no se encuentra limitada a los métodos o algoritmos anteriormente indicados para generar un índice farmacogenético. Utilizando otros análisis estadísticos puede calcularse un índice farmacogenético. Entre estos métodos se incluyen, por ejemplo, la identificación de la presencia o ausencia de un alelo variante en otros sitios polimórficos en otros genes, tales como genes adicionales de la ruta del folato, incluyendo los indicados anteriormente; genes de síntesis de purinas tales como la glutamina-PRPP amidotransferasa, la glicinamida ribonucleótido (GAR) sintetasa, la formilglicinamida ribonucleótido (FGAR) amidotransferasa, la formilglicinamida ribonucleótido (FGAM) ciclasa, la 5-aminoimidazol ribonucleótido (AIR) carboxilasa, la N-succinilo-5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido (SAICAR) sintetasa, la SAICAR liasa, la IMP sintasa, la adenilosuccinato sintetasa, la adenilosuccinato liasa, la IMP deshidrogenasa y la XMP-glutamina amidotransferasa; genes de síntesis de pirimidinas tales como ribonucleótido reductasa, nucleósido difosfato quinasa, desaminasa, desoxiuridina trifosfatasa, aspartato transcarbamoilasa, dihidroorotasa, dihidroorotato deshidrogenasa, orotato fosforibosiltransferasa, orotidilato descarboxilasa y citidilato sintetasa, y combinaciones de los mismos. Además, determinando genes o sitios polimórficos pueden presentar una contribución ponderada, de manera que la importancia del carácter de tipo salvaje, la homocigosidad o la heterocigosidad en ese sitio específico contribuya más peso al índice farmacogenético. También pueden utilizarse otros parámetros, tales como parámetros fenotípicos, en los algoritmos. Entre los algoritmos adicionales adecuados para la utilización en la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el análisis de componentes principales, las redes neuronales, los algoritmos genéticos, la lógica difusa, el reconocimiento de patrones y los algoritmos de emparejamiento de patrones. El experto en la materia conocerá otros algoritmos adecuados para la utilización en la presente invención.

La expresión "módulo de perfilado genotípico" se refiere a cualquier dispositivo o aparato para el genotipado de un individuo en un sitio polimórfico de por lo menos un gen. Entre los módulos de perfilado genotípico adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, micromatrices tales como matrices de oligonucleótidos o polinucleótidos, dispositivos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aparatos de secuenciación o aparatos electroforéticos. Preferentemente el módulo de perfilado genotípico es una micromatriz. Posteriormente se proporciona una descripción de matrices adecuadas.

La expresión "módulo de perfilado farmacogenético" se refiere a cualquier dispositivo, aparato, código de software o una combinación de los mismos para generar un índice farmacogenético con el fin de determinar el nivel de MTXPG en el individuo. Entre los módulos de perfilado farmacogenético adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, cualquier dispositivo o aparato capaz de calcular uno o más índices farmacogenéticos utilizando, por ejemplo, uno o más de los algoritmos anteriormente indicados. A modo de ejemplo no limitativo, se mencionan ordenadores que comprenden software que incluye un medio legible por ordenador que presenta instrucciones ejecutables en el ordenador, para la realización de cálculos algorítmicos. Alternativamente, el módulo de perfilado farmacogenético es un programa de software informático capaz de llevar a cabo cálculos algorítmicos con el fin de generar índices farmacogenéticos. Entre los medios legibles por ordenador adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, disquetes, CD-ROM/DVD/DVD-ROM, unidades de disco duro, memoria flash, ROM/RAM, cintas magnéticas, etc. Las instrucciones ejecutables en un ordenador pueden estar escritas en un lenguaje informático adecuado o en una combinación de varios lenguajes. Se describen métodos básicos de biología computacional en, por ejemplo, Setubal *et al.*, Introduction to Computational Biology Methods, PWS Publishing Company, Boston, 1997; Salzberg, Searles, Kasif, editores, Computational Methods in Molecular Biology, Elsevier, Amsterdam, 1998; Rashidi y Buehler, Bioinformatics Basics: Application in Biological Science and Medicine, CRC Press, London, 2000; y Ouellette y Bzevanis, Bioinformatics: A Practical Guide for Analysis of Gene and Proteins, Wiley & Sons, Inc., 2a edición, 2001. En determinados casos, el módulo de perfilado farmacogenético puede utilizarse conjuntamente con el módulo de perfilado genotípico para el diseño de sondas, gestión de los datos, análisis y/o operación del instrumento.

El término "muestra" se refiere a cualquier espécimen biológico obtenido de un individuo que contiene ácidos nucleicos. Entre las muestras adecuadas para la utilización en la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, sangre completa, plasma, suero, glóbulos rojos, saliva, orina, deposiciones (es decir, heces), lágrimas, cualquier otro líquido corporal, muestras de tejido (por ejemplo biopsias) y extractos celulares de las mismas (por ejemplo extracto de glóbulos rojos).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "administrar" se refiere a la administración oral, a la administración como supositorio, al contacto tópico, a la administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intralesional, intratecal, intranasal o subcutánea o a la implantación de un dispositivo de liberación lenta, por ejemplo una bomba miniosmótica, en un individuo. La administración se lleva a cabo mediante cualquier vía, incluyendo la parenteral y transmucosal (por ejemplo bucal, sublingual, palatal, gingival, nasal, vaginal, rectal o transdérmica). La administración parenteral incluye, por ejemplo, la administración intravenosa, intramuscular, intraarteriolar, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular e intracraneal. Entre otros modos de administración se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, la utilización de formulaciones liposómicas, la infusión intravenosa, los parches transdérmicos, etc.

II. Vista general

La presente invención proporciona métodos para determinar la eficacia de la terapia de MTX en un individuo sometido a terapia de metotrexato (MTX) según se define en las reivindicaciones.

Tal como se da a conocer en la presente memoria, se realizó un seguimiento de la terapia de MTX en pacientes con artritis reumatoide y se identificaron nuevas asociaciones entre polimorfismos genéticos en la ruta del folato (por ejemplo *RFC-1* y *GGH*) y los niveles de MTXPG. En particular, los resultados dados a conocer en el Ejemplo 1 indican que la homocigosidad de los alelos variantes en *RFC-1* y/o *GGH* son predictivos de los niveles de MTXPG en el paciente. De esta manera, el genotipado de un paciente en un sitio polimórfico en *RFC-1* y/o *GGH* puede utilizarse para determinar el nivel de MTXPG en el paciente, que seguidamente puede utilizarse para evaluar la eficacia de la terapia de MTX, con el fin de permitir la ventajosa personalización de las dosis de MTX administradas en el paciente.

III. Descripción de las realizaciones

El individuo presentaba una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria. El individuo podría presentar una enfermedad inflamatoria, tal como artritis reumatoide. Entre los genes adicionales de la ruta del folato adecuados para el genotipado se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, la folilpoliglutamato sintasa (*FPGS*), la 5,10-metilén-tetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*), la 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido transformilasa (*ATIC*), la timidilato sintasa (*TS*), serina-hidroximetiltransferasa (*SHMT*), la dihidrofolato reductasa (*DHFR*), la 10-formiltetrahidrofolato sintetasa (*FTHFS*), la 10-formiltetrahidrofolato deshidrogenasa (*FTHFD*), la glicinamida ribonucleótido transformilasa (*GART*), la aldehído oxidasa, transportadores de entrada/salida tales como las proteínas de resistencia a múltiples fármacos (por ejemplo *MRP2*) y las combinaciones de los mismos.

Los métodos pueden utilizarse para la recomendación (por ejemplo a un médico) de una dosis posterior de metotrexato o de un análogo del mismo basándose en el nivel de MTXPG en el individuo. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "recomendar" o "recomendación" se refiere a proporcionar instrucciones de dosificación de un fármaco (por ejemplo metotrexato o un análogo del mismo) basándose en el nivel de MTXPG en el individuo. Entre las instrucciones de dosificación se incluyen, por ejemplo, resultados de laboratorio con dosis de fármaco preferentes, hojas de datos, tablas que indican las dosis de fármaco preferentes, instrucciones o directrices para la utilización de los fármacos, impresos en el paquete acompañando al fármaco, y similares. A modo de ejemplo no limitativo, en casos en los que la presencia de un alelo variante es indicativo de un nivel incrementado de MTXPG en el individuo, el método puede comprender además la recomendación de que la dosis posterior de metotrexato o de un análogo del mismo se mantenga o se reduzca (por ejemplo a una terapia de dosis baja de MTX) para reducir o prevenir efectos secundarios. Alternativamente, en casos en los que la presencia de un alelo variante es indicativa de un nivel reducido de MTXPG en el individuo, el método puede comprender además la recomendación de que la dosis siguiente de metotrexato o de un análogo del mismo se incremente (por ejemplo a una terapia de dosis elevada de MTX).

El individuo es homocigótico para el alelo variante en la posición 80 del gen *RFC-1* y en la posición 401 del gen *GGH*. En determinados casos, el individuo homocigótico para ambos alelos variantes presente un nivel incrementado de MTXPG respecto a los individuos de tipo salvaje o heterocigóticos. Alternativamente, el individuo presenta un nivel reducido de MTXPG respecto a los individuos de tipo salvaje o heterocigóticos. En otros casos determinados, el individuo homocigótico para ambos alelos variantes presenta un nivel incrementado de MTXPG respecto a los individuos de tipo salvaje o heterocigóticos.

El alelo variante del gen *RFC-1* comprende una mutación 80 G a A en la región codificante de *RFC-1*. El individuo es homocigótico para la mutación 80A de *RFC-1*. En determinados casos, el individuo homocigótico para la mutación 80A de *RFC-1* presenta un nivel incrementado de MTXPG respecto a los individuos de tipo salvaje o heterocigóticos. El alelo variante del gen *GGH* comprende una mutación -401 C a T en el promotor de *GGH*. El individuo es homocigótico para la mutación -401T de *GGH*. En determinados casos, el individuo homocigótico para la mutación -

401 T de *GGH* presenta un nivel reducido de MTXPG respecto a los individuos de tipo salvaje o heterocigóticos.

En algunas realizaciones, el nivel de MTXPG comprende mTXPG₁₋₅. En otras realizaciones, el nivel de MTXPG comprende MTXPG₃₋₅. En determinados casos, el nivel de MTXPG se determina utilizando un análisis de regresión lineal multivariante. Preferentemente, el nivel de MTXPG₁₋₅ se determina según la fórmula:

MTXPG₁₋₅ (mmoles/l) = intersección con eje y + (β_1 x Edad) + (β_2 x Dosis) + (β_3 x Vía de adm.+ (β_5 x genotipo *GGH*), en la que la intersección con eje y = -103 ± 16 ,

$\beta_1 = 2,47 \pm 0,29$,

$\beta_2 = 4,95 \pm 0,78$,

$\beta_3 = 16,2 \pm 8,0$,

$\beta_4 = 20,8 \pm 9,7$?

$\beta_5 = -21,0 \pm 9,6$,

Vía de administración = 0 para oral ó 1 para inyectado,

genotipo *RFC-1* = 0 para 80G/G ó 80G/A, ó 1 para 80A/A, y

genotipo *GGH* = 0 para -401C/C ó -401C/T, ó 1 para -401T/T.

En otra realización preferente, el nivel de MTXPG₃₋₅ se determina según la fórmula:

MTXPG₃₋₅ = intersección con eje y + (β_1 x Edad) + (β_2 x Dosis) + (β_3 x Vía de adm.+ (β_4 x genotipo *RFC-1*) + (β_5 x genotipo *GGH*), en la que la intersección con eje y = -120 ± 24 ,

$\beta_1 = 1,53 \pm 0,20$,

$\beta_2 = 4,39 \pm 0,53$,

$\beta_3 = 15,6 \pm 5,4$,

$\beta_4 = 14,8 \pm 6,6$,

$\beta_5 = -15,3 \pm 6,5$,

Vía de administración = 0 para oral ó 1 para inyectado, genotipo *RFC-1* = 0 para 80G/G ó 80G/A, ó 1 para 80A/A,

genotipo *GGH* = 0 para -401C/C ó -401C/T, ó 1 para -401T/T.

En realizaciones adicionales de la presente invención, los métodos comprenden además el genotipado del individuo en un sitio polimórfico en otros genes de la ruta del folato, genes de síntesis de purinas, genes de síntesis de pirimidinas y combinaciones de los mismos. En determinados casos, el genotipado se lleva a cabo en una muestra de ácidos nucleicos obtenida a partir de sangre completa. Sin embargo, el experto en la materia apreciará que cualquier otra muestra que contenga ácidos nucleicos resulta adecuada para la utilización en los métodos de la presente invención.

La presente invención proporciona una diversidad de métodos o algoritmos para generar diversos índices farmacogenéticos. En una realización, el índice farmacogenético se calcula como la suma o la diferencia entre el número de alelos variantes en los sitios polimórficos de *RFC-1* y *GGH*. En otra realización, el índice farmacogenético se calcula como la suma o la diferencia entre el número de alelos variantes homocigóticos en los sitios polimórficos de *RFC-1* y *GGH*. En una realización preferente, el índice farmacogenético se calcula como la diferencia entre el número de alelos variantes homocigóticos en uno o más sitios polimórficos de *RFC-1* y *GGH*.

De esta manera, en determinados casos, la presente invención proporciona métodos para determinar un nivel de MTXPG en un individuo sometido a terapia de metotrexato, comprendiendo el método:

a) genotipar el individuo en dicho sitio polimórfico en el gen *RFC-1* y en el gen *GGH*, b) identificar la presencia o ausencia de un alelo variante en el sitio polimórfico en los genes *RFC-1* y *GGH*, c) determinar si el individuo es de tipo salvaje, heterocigótico u homocigótico para los alelos variantes en los genes *RFC-1* y *GGH*,

d) asignar al gen *RFC-1* ó *GGH* un valor de 0 en el caso de que el individuo sea de tipo salvaje o heterocigótico para el alelo variante, o un valor de 1 en el caso de que el individuo sea homocigótico para el alelo variante, y

e) generar un índice farmacogenético mediante la resta del valor asignado al gen *GGH* del valor asignado al gen *RFC-1*,

en el que el índice farmacogenético es indicativo del nivel de MTXPG en el individuo.

En una realización, el nivel de MTXPG comprende MTXPG₃₋₅. En determinados casos, el índice farmacogenético es indicativo de un incremento del nivel de MTXPG respecto a los individuos de tipo salvaje. En estos casos, el índice farmacogenético presenta un valor de 1. En determinados otros casos, el índice farmacogenético es indicativo de una reducción del nivel de MTXPG respecto a los individuos de tipo salvaje. En estos casos, el índice farmacogenético presenta un valor de -1.

El índice farmacogenético puede ser indicativo de una probabilidad de que el nivel de MTXPG sea superior a un nivel de mediana. A título de ejemplo no limitativo, el nivel de mediana es de aproximadamente 56 nmoles/l. Entre otros niveles de mediana adecuados para los métodos de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 57, 58, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 y 100 nmoles/l. En

determinados casos, el índice farmacogenético es indicativo de un incremento de la probabilidad de que el nivel de MTXPG sea superior a dicho nivel de mediana respecto a los individuos de tipo salvaje. En estos casos, el índice farmacogenético presenta un valor de 1. En determinados otros casos, el índice farmacogenético es indicativo de una reducción de la probabilidad de que el nivel de MTXPG sea superior a dicho nivel de mediana respecto a los individuos de tipo salvaje. En estos casos, el índice farmacogenético presenta un valor de -1.

En determinados casos, el índice farmacogenético es indicativo de un incremento del nivel de MTXPG respecto a los individuos de tipo salvaje. En estos casos, los métodos de ensayo comprenden la recomendación de que la dosis siguiente de metotrexato o un análogo del mismo se mantenga o se reduzca (por ejemplo a terapia de dosis baja de MTX) para reducir o prevenir efectos secundarios. Alternativamente, en casos en los que el índice farmacogenético es indicativo de un nivel reducido de MTXPG respecto a los individuos de tipo salvaje, los métodos de ensayo comprenden la recomendación de que la dosis siguiente de metotrexato o un análogo del mismo se incremente (por ejemplo a una terapia de dosis elevada de MTX).

Se dan a conocer sistemas para determinar un nivel de MTXPG en un individuo sometido a terapia de metotrexato, comprendiendo el sistema:

- a) un módulo de perfilado genotípico para genotipar el individuo en un sitio polimórfico en por lo menos un gen seleccionado de entre el grupo que consiste de un gen *RFC-1*, un gen *GGH* y una combinación de los mismos, y
- b) un módulo de perfilado farmacogenético para generar un índice farmacogenético para determinar el nivel de MTXPG en el individuo.

El individuo podría presentar una enfermedad inflamatoria, tal como la artritis reumatoide. El módulo de perfilado genotípico es cualquier dispositivo o aparato adecuado para genotipar el individuo en un sitio polimórfico en *RFC-1*, *GGH* o una combinación de los mismos. Entre los módulos de perfilado genotípico se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, micromatrices tales como matrices de oligonucleótidos o polinucleótidos, dispositivos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aparatos de secuenciación y aparatos electroforéticos. En determinados casos, la micromatriz comprende una pluralidad de sondas de ácidos nucleicos que se hibridan con *RFC-1* ó *GGH*. El módulo de perfilado farmacogenético es cualquier dispositivo o aparato adecuado para generar un índice farmacogenético para determinar el nivel de MTXPG en el individuo. Entre los ejemplos de módulos de perfilado farmacogenético se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, programas de software informático capaces de llevar a cabo cálculos algorítmicos para generar índices farmacogenéticos y ordenadores que contienen dichos programas informáticos. En determinados casos, el algoritmo se basa en la presencia o ausencia de un alelo variante de *RFC-1*, *GGH* o una combinación de los mismos. El experto en la materia conocerá módulos de perfilado genotípico adicionales y módulos de perfilado farmacogenético adecuados para la utilización en los sistemas de la presente invención.

Se dan a conocer kits para determinar un nivel de MTXPG en un individuo sometido a terapia de metotrexato, comprendiendo el kit:

- a) un módulo de perfilado genotípico para genotipar el individuo en un sitio polimórfico en por lo menos un gen seleccionado de entre el grupo que consiste de un gen *RFC-1*, un gen *GGH*, y una combinación de los mismos, y
- b) un módulo de perfilado farmacogenético para generar un índice farmacogenético con el fin de determinar el nivel de MTXPG en el individuo.

En una realización, el kit puede comprender además instrucciones de utilización del módulo de perfilado genotípico y del módulo de perfilado farmacogenético. Los módulos de perfilado genotípico y de perfilado farmacogenético adecuados para la utilización en los kits se han descrito anteriormente. Preferentemente, el módulo de perfilado genotípico es una micromatriz, tal como una matriz de oligonucleótidos o de polinucleótidos.

A. Terapia de metotrexato

El metotrexato es bien conocido de la técnica como inhibidor de la dihidrofolato reductasa (DHFR), la cual actúa reduciendo la producción de tetrahidrofolato (THF) a partir de dihidrofolato (DHF). En consecuencia, el metotrexato inhibe indirectamente la síntesis de purinas y timidina y la interconversión de aminoácidos. El metotrexato también muestra actividad antiproliferativa mediante la inhibición de la síntesis de timidilato, el cual resulta necesario para sintetizar el ADN (Calvert, Semin. Oncol. 26:3-10, 1999). El metotrexato, su síntesis y sus propiedades se describen en mayor detalle en las patentes US nº 2.512.572, 3.892.801, 3.989.703, 4.057.548, 4.067.867, 4.079.056, 4.080.325, 4.136.101, 4.224.446, 4.306.064, 4.374.987, 4.421.913 y 4.767.859. Los métodos para utilizar metotrexato para tratar el cáncer se describen en, por ejemplo, las patentes US nº 4.106.488, 4.558.690 y 4.662.359.

El metotrexato, que resulta útil en el tratamiento de una diversidad de enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias y cánceres, puede administrarse por vía oral o parenteral. El fármaco se distribuye fácilmente en los tejidos corporales, en donde es transportado al interior de las células mediante un sistema portador específico

que incluye componentes, tales como el portador de folato reducido (RFC1) y el receptor de folato. Debido a su elevada polaridad a pH fisiológico, el metotrexato no pase con facilidad a través de la membrana celular, y la mayor parte del fármaco entra en las células mediante portadores específicos. Tras introducirse en la célula, el metotrexato es convertido en poliglutamatos de metotrexato (MTXPG) por enzimas específicos tales como la folilpoliglutamato sintasa (FPGS), que añade una o más fracciones de ácido glutámico, unidas mediante enlaces isopeptídicos al γ -carboxilo del metotrexato, tal como se describe en, por ejemplo, Kamen, *Semin. Oncol.* S18:30-39, 1997).

Los métodos pueden utilizarse para determinar el nivel de un análogo de metotrexato poliglutamado u otros compuestos antifolato poliglutamables. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "análogo de metotrexato" se refiere a un compuesto que presenta similitudes estructurales y funcionales con el metotrexato. Los análogos de metotrexato se caracterizan funcionalmente, en parte, por su actividad inhibidora contra la dihidrofolato reductasa (DHFR). Un análogo de metotrexato que resulta útil en la presente invención actúa como sustrato para la poliglutamación en una célula por un enzima tal como FPGS. Entre los análogos de metotrexato se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los derivados 4-amino con sustitución de halógeno en la fracción para-aminobenzoico, tal como diclorometotrexato (ver, por ejemplo, Frei *et al.*, *Clin. Pharmacol. Therap.* 6:160-71, 1965), MTX 7-metilo sustituido (ver, por ejemplo, Rosowsky *et al.*, *J. Med. Chem.* 17:1308-11, 1974); 3',5'-difluoro-MTX (ver, por ejemplo, Tomcuf, *J. Organic Chem.* 26:3351, 1961), derivados 2' y 3'-monofluorados de aminopterina (ver, por ejemplo, Henkin *et al.*, *J. Med. Chem.* 26:1193-1196, 1983) y 7,8-dihidro-8-metil-MTX (ver, por ejemplo, Chaykovsky, *J. Org. Chem.* 40:145-146, 1975).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "antifolato" se refiere a un compuesto que presenta similitudes estructurales con el folato y actividad como antagonista de folato contra uno o más enzimas dependientes del folato. Los compuestos antifolato poliglutamable son compuestos antifolato que pueden ser poliglutamados en una célula por un enzima tal como FPGS. Entre los ejemplos de compuestos antifolato poliglutamables se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, metotrexato (MTX), aminopterina, raltitrexed, lometrexol, antifolato multidiana (MTA), AQA y análogos de los mismos. La aminopterina, por ejemplo, presenta un hidrógeno en lugar de un grupo metilo en la posición N-10 en comparación con la estructura del metotrexato. El raltitrexed es un inhibidor selectivo de la timidilato sintasa, tal como se describe en, por ejemplo, Kamen, *supra*. El lometrexol inhibe selectivamente la glicinamida ribonucleótido formiltransferasa, el primer enzima implicado en la ruta de síntesis *de novo* de purinas, tal como se describe en, por ejemplo, Calvert, *supra*. El antifolato multidiana (MTA) es un inhibidor de múltiples enzimas dependientes de folato, tales como la dihidrofolato reductasa, la timidilato sintasa y la glicinamida ribonucleótido formiltransferasa (ver, por ejemplo, Calvert, *supra*). Entre otros compuestos antifolato adecuados para la utilización en la presente invención se incluyen, por ejemplo, edetrexato, lometrexol, BW1843U89 y ZD1694. En determinados casos, se utiliza el metotrexato en una terapia de combinación con uno o más análogos de metotrexato y/o otros compuestos antifolato poliglutamables. El experto en la materia entenderá que los métodos de la presente invención pueden utilizarse para determinar un nivel de un análogo de metotrexato poliglutamado u otros compuestos antifolato poliglutamables de la misma manera que la dada a conocer en la presente memoria para los poliglutamatos de metotrexato.

La artritis reumatoide y una diversidad de otras enfermedades inflamatorias o trastornos autoinmunitarios, tales como la soriasis, el lupus eritematoso sistémico y la enfermedad del huésped contra el injerto típicamente se tratan con terapia de dosis baja de metotrexato, que también se utiliza en algunos regímenes de tratamiento del cáncer. Se dan a conocer métodos para determinar un nivel de MTXPG en un individuo o para optimizar la eficacia de las dosis de la terapia de MTX en un individuo sometido a terapia de dosis baja de MTX. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "terapia de dosis baja de MTX" se refiere a la administración de metotrexato en un individuo a una dosis que es inferior a 40 mg/m² de superficie corporal a la semana. Típicamente se administra por vía oral terapia de dosis baja de metotrexato a una dosis comprendida en el intervalo de 2,5 a 40 mg/m² de superficie corporal a la semana, por ejemplo 2,5 a 25 mg/m² de superficie corporal a la semana, dependiendo de la condición bajo tratamiento. En determinados casos, en el caso de que la terapia de dosis baja de MTX proporcione niveles terapéuticamente efectivos de MTXPG en un individuo, no se modifica la dosis de MTX administrada en el individuo. En determinados otros casos, en el caso de que la terapia de dosis baja de MTX proporcione niveles terapéuticamente no efectivos de MTXPG en un individuo, se administra en el individuo una dosis más alta de MTX (por ejemplo superior a 40 mg/m² de superficie corporal a la semana).

También se dan a conocer métodos para determinar un nivel de MTXPG en un individuo o para optimizar la eficacia de las dosis de la terapia de MTX en un individuo sometido a terapia de dosis alta de MTX. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "terapia de dosis alta de MTX" se refiere a la administración de metotrexato en un individuo a una dosis que es de por lo menos 40 mg/m² de superficie corporal al día, por ejemplo de por lo menos 100, 500, 1.000, 1.500, 3.000 ó 5.000 mg/m² de superficie corporal al día. El experto en la materia entenderá que la terapia de dosis alta de metotrexato se utiliza con frecuencia como terapia anticáncer y puede administrarse a dosis de hasta 5 g/m² de superficie corporal al día o más alta según la condición o enfermedad bajo tratamiento. El experto en la materia reconoce que las dosis de metotrexato típicamente utilizadas en la terapia de dosis alta de MTX pueden administrarse, por ejemplo, por vía intravenosa u oral y que dicha terapia de dosis alta de metotrexato

generalmente requiere un periodo de recuperación, que puede incluir el rescate con leucovorina u otra forma de sustitución del folato. En determinados casos, en el caso de que la terapia de dosis alta de MTX proporcione niveles terapéuticamente efectivos de MTXPG en un individuo, no se modifica la dosis de MTX administrada en el individuo, aunque la dosis también puede reducirse para obtener un equilibrio más óptimo de eficacia terapéutica elevada y pocos efectos adversos. En determinados otros casos, en el caso de que la terapia de dosis alta de MTX proporcione niveles terapéuticamente no efectivos de MTXPG en un individuo, se administra una dosis más alta de MTX en el individuo.

Se entenderá que los intervalos de dosis de metotrexato indicados anteriormente en las definiciones de terapia de dosis baja y de dosis alta de MTX, son generales con respecto al tratamiento de una diversidad de enfermedades y que el intervalo de dosis de metotrexato que se administra para una enfermedad puede diferir del intervalo administrado para otra. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, una dosis de 40 mg/m² de superficie corporal al día, aunque se considera generalmente una terapia de dosis alta de metotrexato, el experto en la materia de la terapia del cáncer podrá considerarla una dosis relativamente baja para el tratamiento del cáncer. De manera similar, una dosis de 30 mg/m² de superficie corporal al día, aunque se considera generalmente una terapia de dosis baja de metotrexato, el experto en reumatología podrá considerarla una dosis relativamente alta para el tratamiento de la artritis reumatoide.

B. Enfermedades y trastornos

Se dan a conocer métodos que resultan útiles para determinar un nivel de MTXPG en un individuo o para optimizar la eficacia del metotrexato o de un análogo del mismo en un individuo sometido a terapia de MTX, incluyendo la terapia de dosis baja y de dosis alta de metotrexato. En una realización, la presente invención proporciona métodos para determinar un nivel de MTXPG en un individuo sometido a terapia de MTX o para optimizar la eficacia de dosis de la terapia de MTX en un individuo que presenta una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria. En determinados casos se utiliza el metotrexato para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, tal como las enfermedades intestinales inflamatorias, la enfermedad reumatoide (por ejemplo la artritis reumatoide), otras enfermedades artríticas, la fibrositis, la enfermedad inflamatoria pélvica, el acné, la soriasis, la actinomicosis, la disentería, la cirrosis biliar, la enfermedad de Lyme, la fiebre miliaria, el síndrome de Stevens Johnson, la parotiditis, el péñigo vulgar y la blastomicosis. En determinados otros casos, se utiliza metotrexato para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria tal como la diabetes mellitus de tipo I, la miastenia grave, la enfermedad de Graves, la enfermedad de Hashimoto, la enfermedad de Addison, la gastritis autoinmunitaria, la hepatitis autoinmunitaria, el lupus eritematoso sistémico, la esclerosis sistémica progresiva y variantes, la polimiositis, la dermatomiositis, la anemia perniciosa, la cirrosis biliar primaria, la trombocitopenia autoinmunitaria, el síndrome de Sjögren y la esclerosis múltiple.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "artritis" se refiere a una condición inflamatoria que afecta a las articulaciones. La artritis puede ser, por ejemplo, de origen infeccioso, autoinmunitario o traumático, e incluye, aunque sin limitarse a ellas, la artritis aguda, la artritis gotosa aguda, la artritis bacteriana, la artritis inflamatoria crónica, la artritis degenerativa (osteoartritis), la artritis infecciosa, la artritis juvenil, la artritis micótica, la artritis neuropática, la poliartritis, la artritis proliferativa, la artritis psoriática, la artritis reumatoide juvenil, la artritis reumatoide, la artritis venérea y la artritis vírica. En una realización preferente, la artritis es la artritis reumatoide. La artritis reumatoide es una enfermedad sistémica crónica principalmente de las articulaciones y habitualmente es poliarticular, marcada por cambios inflamatorios en las membranas sinoviales y estructuras articulares y por la atrofia muscular y la rarefacción de los huesos. El metotrexato se utiliza ampliamente en el tratamiento de la artritis reumatoide, y el experto en la materia reconocerá que los métodos pueden ponerse en práctica en una muestra tal como un extracto celular procedente de un ser humano o de otro mamífero que presente artritis reumatoide u otra forma de artritis.

También se dan a conocer métodos para determinar un nivel de MTXPG en un individuo sometido a terapia de MTX o para optimizar la eficacia de las dosis de la terapia de MTX en un individuo que presenta cáncer. Por ejemplo, el metotrexato se utiliza para el tratamiento de un cáncer, tal como cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de tiroides, cáncer hepático, cáncer pleural, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer cervical, cáncer testicular, cáncer de colon, cáncer anal, cáncer de los conductos biliares, tumores carcinoides gastrointestinales, cáncer esofágico, cáncer de la vesícula biliar, cáncer rectal, cáncer del apéndice, cáncer del intestino delgado, cáncer de estómago (gástrico), cáncer renal, cáncer del sistema nervioso central, cáncer de piel, coriocarcinomas, cánceres de cabeza y cuello, y sarcomas osteogénicos, linfoma de células B, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Burkitt, fibrosarcoma, neuroblastoma, glioma, melanoma, leucemia monocítica, leucemia mielógena, leucemia linfocítica aguda y leucemia mielocítica aguda.

C. Alelos variantes

Los métodos de la presente invención se basan en el genotipado de un individuo para detectar alelos variantes

particulares en sitios polimórficos en los genes de la ruta del folato *RFC-1* y *GGH*. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "alelo variante" se refiere a una variación molecular heredable que resulta en niveles o actividad del producto génico alterados. De esta manera, un alelo *RFC-1* variante es una variación molecular establemente heredable que resulta en niveles o actividad de *RFC-1* alterados. De manera similar, un alelo *GGH* variante es una variación molecular establemente heredable que resulta en niveles o actividad de *GGH* alterados.

Entre los alelos variantes se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP), microsatélites (ms), polimorfismos de repetición en tándem de número variable (VNTR) y sustituciones, inserciones o deleciones de uno o más nucleótidos. El experto en la materia entenderá que un alelo variante también puede comprender una variación molecular, tal como la metilación anormal u otra modificación que no produzca una diferencia en la secuencia primaria de nucleótidos del alelo variante en comparación con el alelo de tipo salvaje.

El portador de folato reducido SLC19 A1 (*RFC-1*) es bien conocido de la técnica y se describe en, por ejemplo, Matherly, Prog. Nucl. Acid Res. 67:131-162, 2001. La secuencia codificante de *RFC-1* humana se encuentra disponible en el n° de acceso de GenBank AH006305, y la secuencia genómica de *RFC-1* se encuentra disponible en los números de acceso de GenBank U92873, U92872, U92871, U92870, U92869 y U92868.

Un alelo variante en un sitio polimórfico en el gen *RFC-1* se encuentra situado dentro del locus *RFC-1*, que incluye regiones codificantes del gen *RFC-1*, así como regiones no codificantes, tales como intrones y regiones 5' y 3' no traducidas. El experto en la materia entenderá que dicho alelo variante puede encontrarse en un sitio polimórfico dentro de, por ejemplo, la secuencia codificante de *RFC-1*, una región de promotor en posición 5' respecto a la secuencia codificante de *RFC-1*, una región intensificadora en posición 5' ó 3' respecto a la secuencia codificante de *RFC-1*, una secuencia intrónica de *RFC-1* o una región de estabilidad del ARNm en posición 3' respecto a la secuencia codificante de *RFC-1*. En una realización, el alelo variante en un sitio polimórfico en un gen *RFC-1* se encuentra situado dentro de la secuencia codificante de *RFC-1*. Según la invención, el alelo variante del gen *RFC-1* comprende una mutación 80 G a A en la región codificante de *RFC-1*.

La homocigosidad de alelos variantes de *RFC-1* es indicativa de un nivel incrementado de MTXPG en el individuo respecto a los individuos de tipo salvaje o heterocigóticos y la homocigosidad de alelos variantes de *RFC-1* es indicativa de una eficacia superior de la terapia de metotrexato en el individuo.

La γ -glutamil-hidrolasa (*GGH*) es conocida de la técnica y se describe en, por ejemplo, Yao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 93:10134-10138, 1996. La secuencia codificante de *GGH* humana se encuentra disponible en GenBank n° de acceso U55206.

Un alelo variante en un sitio polimórfico en el gen *GGH* se encuentra situado dentro del locus *GGH*, que incluye regiones codificantes del gen *GGH*, así como regiones no codificantes, tales como intrones y regiones 5' y 3' no traducidas. El experto en la materia entenderá que dicho alelo variante puede encontrarse en un sitio polimórfico dentro de, por ejemplo, la secuencia codificante de *GGH*, una región de promotor en posición 5' respecto a la secuencia codificante de *GGH*, una región intensificadora en posición 5' ó 3' respecto a la secuencia codificante de *GGH*, una secuencia intrónica de *GGH* o una región de estabilidad del ARNm en posición 3' respecto a la secuencia codificante de *GGH*. El alelo variante en un sitio polimórfico en un gen *GGH* se encuentra situado dentro de la región promotora 5' respecto a la secuencia codificante de *GGH* y comprende una mutación -401 C a T en el promotor de *GGH*.

La homocigosidad de alelos variantes de *GGH* es indicativa de un nivel reducido de MTXPG en el individuo respecto a los individuos de tipo salvaje o heterocigóticos y la homocigosidad de alelos variantes de *GGH* es indicativa de una eficacia inferior de la terapia de metotrexato en el individuo.

D. Métodos de genotipado

Puede utilizarse una diversidad de técnicas para genotipar un individuo en un sitio polimórfico en por lo menos un gen de la ruta del folato (por ejemplo *RFC-1*, *GGH*, etc.) según los métodos de la presente invención. Por ejemplo, la amplificación enzimática de ácidos nucleicos de un individuo puede utilizarse convenientemente para obtener ácidos nucleicos para el análisis posterior. Sin embargo, la presencia o ausencia de un alelo variante en un gen de la ruta del folato también puede determinarse directamente a partir de los ácidos nucleicos del individuo sin amplificación enzimática.

El genotipado de ácidos nucleicos de un individuo, amplificados o no, puede llevarse a cabo utilizando cualquiera de entre diversas técnicas conocidas por el experto en la materia. Entre las técnicas útiles se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, los análisis basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el análisis de secuencias, el análisis basado en matrices y el análisis electroforético, los cuales pueden utilizarse solos o en combinación. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "ácido nucleico" se refiere a un polinucleótido, tal como una

molécula de ADN o ARN de cadena sencilla o de doble cadena, incluyendo, por ejemplo, ADN genómico, ADNc y ARNm. Dicha expresión comprende las moléculas de ácidos nucleicos de origen tanto natural como sintético, así como las moléculas de configuración lineal, circular o ramificada que representan la cadena de sentido o antisentido, o ambas, de una molécula nativa de ácidos nucleicos. Se entiende que dichos ácidos nucleicos puede encontrarse en estado no purificado, purificado o ligado, por ejemplo a un material sintético, tal como una matriz de perla o columna.

Puede obtenerse rutinariamente una muestra que contiene ácidos nucleicos a partir de un individuo. Dicha muestra se refiere a cualquier materia biológica a partir de la que pueden prepararse ácidos nucleicos. A título de ejemplos no limitativos, una muestra puede ser sangre completa, plasma, suero, saliva, raspado bucal u otro líquido corporal, tejido o extracto que contenga ácidos nucleicos. En una realización, puede ponerse en práctica un método de la presente invención con sangre completa, que puede obtenerse fácilmente por medios no invasivos y utilizarse para preparar ADN genómico. En otra realización, el genotipado implica la amplificación de los ácidos nucleicos de un individuo utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La utilización de la PCR para la amplificación de ácidos nucleicos es bien conocida de la técnica (ver, por ejemplo, Mullis *et al.*, editores, The Polymerase Chain Reaction, Birkhäuser, Boston, 1994. En todavía otra realización, la amplificación por PCR se lleva a cabo utilizando uno o más cebadores marcados fluorescentemente. En una realización adicional, la amplificación por PCR se lleva a cabo utilizando uno o más cebadores marcados o no marcados que contienen un ligante del surco menor del ADN.

Puede utilizarse cualquiera de entre una diversidad de cebadores diferentes para amplificar los ácidos nucleicos de un individuo mediante PCR. Por ejemplo, pueden utilizarse los cebadores de PCR dados a conocer en el Ejemplo 1 para amplificar la secuencia circundante a un sitio polimórfico particular en *RFC-1* ó *GGH*. Tal como entenderá el experto en la materia, pueden diseñarse cebadores adicionales para el análisis de PCR basándose en la secuencia flanqueante del sitio o sitios polimórficos de interés. A título de ejemplo no limitativo, un cebador de secuencia puede contener entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 nucleótidos de una secuencia cadena arriba o abajo del sitio polimórfico de interés. Dichos cebadores generalmente se diseñan para presentar un contenido suficiente de guanina y citosina para alcanzar una temperatura de fusión elevada que permita una etapa de hibridación estable en la reacción de amplificación. Se encuentran disponibles varios programas informáticos, tales como Primer Select, de ayuda en el diseño de cebadores de PCR.

Un ensayo de discriminación alélica Taqman[®] disponible de Applied Biosystems puede resultar útil para genotipar un individuo en un sitio polimórfico y determinar de esta manera la presencia o ausencia de un alelo variante. En un ensayo de discriminación alélica Taqman[®], se construye una sonda específica marcada con un pigmento fluorescente para cada alelo. Las sondas contienen diferentes pigmentos informadores fluorescentes, tales como FAM y VIC, para diferenciar la amplificación de cada alelo. Además, cada sonda presenta un pigmento inactivador en un extremo que desactiva la fluorescencia mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia. Durante la PCR, cada sonda se hibrida específicamente a secuencias complementarias en el ácido nucleico del sujeto. La actividad 5' nucleasa de la polimerasa Taq se utiliza para cortar únicamente la sonda que se hibrida con el alelo. El corte separa el pigmento informador del pigmento desactivador, resultando en una fluorescencia incrementada por parte del pigmento informador. De esta manera, la señal de fluorescencia generada mediante amplificación por PCR indica qué alelos se encuentran presentes en la muestra. Los apareamientos incorrectos entre una sonda y un alelo reducen la eficiencia tanto de la hibridación como el corte de las sondas por parte de la polimerasa Taq, resultando en una señal fluorescente débil o nula. El experto en la materia entenderá que puede conseguirse una especificidad mejorada en los ensayos de discriminación alélica mediante la conjugación de un grupo ligante del surco menor del ADN (LSM) a una sonda de ADN, tal como se describe en, por ejemplo, Kutayavin *et al.*, Nuc. Acids Research 28: 655-661, 2000. Entre los ligantes del surco menos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, compuestos tales como el tripéptido dihidrociclopilroloindol (DPI3).

El análisis de secuencias también puede resultar útiles para genotipar un individuo en un sitio polimórfico. Un alelo variante puede detectarse mediante análisis de secuencias utilizando los cebadores apropiados, que se diseñan basándose en la secuencia que flanquea el sitio polimórfico de interés, tal como es conocido por el experto en la materia. A título de ejemplo no limitativo, un cebador de secuencia puede contener entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 nucleótidos de una secuencia que corresponde a una secuencia de entre aproximadamente 40 y aproximadamente 400 pares de bases cadena arriba o abajo del sitio polimórfico de interés. Dichos cebadores generalmente se diseñan para presentar un contenido suficiente de guanina y citosina para alcanzar una temperatura de fusión elevada que permita una etapa de hibridación estable en la reacción de secuenciación.

La expresión "análisis de secuencia" se refiere a cualquier procedimiento manual o automático por el que se determine el orden de los nucleótidos en un ácido nucleico. A título de ejemplo, puede utilizarse el análisis de secuencias para determinar la secuencia de nucleótidos de una muestra de ADN. La expresión análisis de secuencias comprende, aunque sin limitación, métodos químicos y enzimáticos tales como los métodos enzimáticos de dideoxi, incluyendo, por ejemplo, las secuenciaciones de Maxam-Gilbert y de Sanger, así como las variaciones de las mismas. La expresión análisis de secuencia comprende además, aunque sin limitación, la secuenciación del

ADN mediante matriz capilar, que se basa en la electroforesis capilar, y la detección de fluorescencia inducida por láser y puede llevarse a cabo utilizando instrumentos tales como MegaBACE 1000 ó ABI 3700. A título de ejemplos no limitativos adicionales, la expresión "análisis de secuencias" comprende la secuenciación de ciclo térmico (Sears *et al.*, *Biotechniques* 13:626-633, 1992), la secuenciación en fase sólida (Zimmerman *et al.*, *Methods Mol. Cell Biol.* 3:39-42, 1992, y la secuenciación con espectrometría de masas, tal como la espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización por láser asistida por matriz (EM MALDI-TOF; Fu *et al.*, *Nature Biotech.* 16:381-384, 1998). La expresión "análisis de secuencia" incluye, aunque sin limitación, la secuenciación mediante hibridación (SMH), la cual se basa en una matriz de todos los posibles oligonucleótidos cortos con el fin de identificar un segmento de una secuencia (Chee *et al.*, *Science* 274:610-614, 1996; Drmanac *et al.*, *Science* 260:1649-1652, 1993, y Drmanac *et al.*, *Nature Biotech.* 16:54-58 (1998)). El experto en la materia entenderá que dichas variaciones, y variaciones adicionales, se encuentran comprendidas en la expresión análisis de secuencia tal como se define en la presente memoria.

El análisis electroforético también puede resultar útil en el genotipado de un individuo según los métodos de la presente invención. La expresión "análisis electroforético" tal como se utiliza en la presente memoria en referencia a uno o más ácidos nucleicos, tales como fragmentos amplificados, se refiere a un procedimiento en el que moléculas con carga se desplazan por un medio estacionario bajo la influencia de un campo eléctrico. La migración electroforética separa los ácidos nucleicos principalmente a partir de su carga, que es proporcional a su tamaño, migrando más rápidamente las moléculas más pequeñas. La expresión "análisis electroforético" incluye, sin limitación, el análisis mediante electroforesis en placa de gel, tal como la electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida, o la electroforesis capilar. El análisis electroforético capilar generalmente se produce en el interior de un capilar de cuarzo de pequeño diámetro (50 a 100 m) en presencia de altos voltajes (nivel de kilovoltios) de separación con tiempos de separación de unos cuantos minutos. Mediante la utilización del análisis electroforético capilar, pueden detectarse convenientemente ácidos nucleicos a partir de la absorción de U.V. o el marcaje fluorescente, y puede alcanzarse una resolución de bases individuales en fragmentos de hasta varios cientos de pares de bases. Dichos métodos de análisis electroforético, y las variaciones de los mismos, son bien conocidos de la técnica, tal como se describe en, por ejemplo, Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, capítulo 2 (suplemento 45), John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999.

El análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PLFR) también puede resultar útil para genotipar un individuo en un sitio polimórfico según los métodos de la presente invención (Jarcho *et al.*, en: Dracopoli *et al.*, *Current Protocols in Human Genetics*, páginas 2.7.1-2.7.5, John Wiley & Sons, New York; Innis *et al.* (editor), *PCR Protocols*, San Diego: Academic Press, Inc., 1990). Tal como se utiliza en la presente memoria, "análisis de PLFR" se refiere a cualquier método para distinguir alelos polimórficos utilizando un enzima de restricción, que es una endonucleasa que cataliza la degradación de ácidos nucleicos tras el reconocimiento de una secuencia de bases específica, generalmente un palíndromo o una repetición invertida. El experto en la materia entenderá que la utilización del análisis de PLFR depende del enzima que puede diferenciar un alelo variante de un alelo de tipo salvaje u otro alelo en un sitio polimórfico.

Además, la hibridación de oligonucleótidos específica de alelo puede resultar útil para genotipar un individuo en los métodos de la presente invención. La hibridación de oligonucleótidos específica de alelo se basa en la utilización de una sonda oligonucleótida marcada que presenta una secuencia perfectamente complementaria a, por ejemplo, la secuencia que comprende el alelo variante. Bajo condiciones apropiadas, la sonda específica de alelo variante se hibrida con un ácido nucleico que contiene el alelo variante pero que no se hibrida con otro u otros alelos que presentan uno o más nucleótidos desapareados en comparación con la sonda. Si se desea, también puede utilizarse una segunda sonda oligonucleótida específica de alelo de secuencia complementaria a un alelo alternativo (por ejemplo de tipo salvaje). De manera similar, puede utilizarse la técnica de amplificación de oligonucleótidos específicos de alelo para amplificar selectivamente, por ejemplo, un alelo variante mediante la utilización de un cebador oligonucleótido específico de alelo que es perfectamente complementario a la secuencia de nucleótidos del alelo variante pero que presenta uno o más apareamientos incorrectos en comparación con otros alelos (Mullis *et al.*, *supra*). El experto en la materia entenderá que uno o más apareamientos incorrectos de nucleótidos que distinguen entre el alelo variante y los demás alelos con frecuencia se encuentran situados en el centro de un cebador oligonucleótido específico de alelo que se utiliza en la hibridación de oligonucleótidos específica de alelo. En contraste, un cebador oligonucleótido específico de alelo que se utiliza en la amplificación por PCR generalmente contiene el apareamiento o apareamientos incorrectos que distinguen entre la variante y los demás alelos en el extremo 3' del cebador.

Un ensayo de movilidad del heterodúplex (EMH) es otro ensayo bien conocido que puede utilizarse para el genotipado en un sitio polimórfico en los métodos de la presente invención. El EMH resulta útil para detectar la presencia de un alelo variante debido a que un ADN dúplex portador de un apareamiento incorrecto presenta una movilidad reducida en un gel de poliacrilamida en comparación con la movilidad de un dúplex con apareamiento perfecto de los pares de bases (Delwart *et al.*, *Science* 262:1257-1261, 1993; White *et al.*, *Genomics* 12:301-306, 1992).

La técnica de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (PCCS) también puede resultar útil para genotipar en un sitio polimórfico en los métodos de la presente invención (ver, por ejemplo, Hayashi, *Methods Applic.* 1:34-38, 1991). Esta técnica se utiliza para detectar alelos variantes basándose en diferencias en la estructura secundaria del ADN de cadena sencilla que producen una movilidad electroforética alterada en la electroforesis en gel no desnaturizante. Se detectan alelos variantes mediante comparación del patrón electroforético del fragmento de ensayo con fragmentos estándares correspondientes que contienen alelos conocidos.

La electroforesis en gradiente de gel desnaturizante (EGGD) puede resultar útil en los métodos de la presente invención. En la EGGD, se somete a electroforesis ADN de doble cadena en un gel que contiene una concentración creciente de agente desnaturizante; los fragmentos de doble cadena formados de alelos no complementarios presentan segmentos que se funden más rápidamente, provocando que dichos fragmentos migren de manera diferente a la de las secuencias perfectamente complementarias (Sheffield *et al.*, "Identifying DNA Polymorphisms by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis", en: Innis *et al.*, *supra*, 1990).

Los métodos basados en matrices para el genotipado de un individuo en múltiples sitios polimórficos resultan particularmente útiles en los métodos de la presente invención. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "micromatriz" se refiere a una matriz de ácidos nucleicos diferentes (por ejemplo polinucleótidos, oligonucleótidos, etc.) sintetizados sobre un sustrato, tal como papel, membrana (por ejemplo nilón), filtro, chip, portaobjetos de vidrio o cualquier otro soporte sólido adecuado. Las micromatrices típicamente comprenden una pluralidad de diferentes sondas de ácidos nucleicos que se acoplan a una superficie de un sustrato en localizaciones conocidas diferentes. En determinados casos, pueden producirse micromatrices utilizando métodos mecánicos de síntesis, tal como se describe en, por ejemplo, la patente US nº 5.384.261. En determinados otros casos, pueden producirse micromatrices utilizando métodos de síntesis dirigidos por luz, que incorporan una combinación de métodos fotolitográficos y de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida, tal como se describe en, por ejemplo, Fodor *et al.*, *Science* 251: 767-777, 1999; patentes US nº 5.143.854 y nº 5.424.186.

Cualquiera de entre una diversidad de técnicas de genotipado utilizando micromatrices se encuentra comprendida dentro del alcance de la presente invención. En una realización, se genotipa un individuo en uno o más sitios polimórficos utilizando una matriz de sondas oligonucleótidas. Por ejemplo, la patente US nº 5.858.659 describe un método para analizar marcadores polimórficos o bialélicos utilizando matrices de sondas oligonucleótidos que son capaces de discriminar entre los genotipos de tipo salvaje, heterocigóticos y homocigóticos de los genes de interés. Además, la publicación de patente US nº 2005/0042654 describe un método para analizar sitios polimórficos de nucleótido único utilizando matrices de sondas oligonucleótidas específicas de alelo. Otros métodos de genotipado con matrices de sondas oligonucleótidas se describen en, por ejemplo, las patentes US nº 5.856.092, nº 6.300.063, nº 6.284.460, nº 6.361.947 y nº 6.368.799, y en las publicaciones de patente US nº 2003/0186279, nº 2004/0146890 y nº 2005/0074787. En otra realización, se genotipa un individuo en uno o más sitios polimórficos utilizando una matriz de sondas polinucleótidas. Por ejemplo, Flavell *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 31:e115, 2003, describe un método basado en matrices para detectar polimorfismos de nucleótidos únicos utilizando productos de PCR específicos de alelo terminados en biotina aplicados en puntos sobre portaobjetos de vidrio recubiertos con estreptavidina y visualizados mediante hibridación de oligonucleótidos detectores fluorescentes a etiquetas unidas a los cebadores de PCR específicos de alelo. Además, Ji *et al.*, *Mut. Res.* 548:97-105, 2004, describe un método basado en matrices para detectar polimorfismos de nucleótidos únicos utilizando productos de PCR amplificados aplicados en puntos sobre portaobjetos de vidrio que seguidamente se interrogan mediante hibridación con sondas de doble color. El experto en la materia conocerá métodos adicionales para genotipar un individuo en uno o más sitios polimórficos utilizando matrices de sondas oligonucleótidas o polinucleótidas.

Otros métodos moleculares útiles para el genotipado de un individuo en un sitio polimórfico son conocidos de la técnica y resultan útiles en los métodos de la presente invención. Entre dichos enfoques bien conocidos de genotipado se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, las técnicas de secuenciación automática y de apareamientos incorrectos con ARNasa (Winter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:7575-7579, 1985). Además, el experto en la materia entenderá que, en el caso de que deba determinarse la presencia o ausencia de múltiples alelos variantes, pueden detectarse alelos variantes individuales mediante cualquier combinación de métodos moleculares. Ver, en general, Birren *et al.*, editores, *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, volumen 1 (Analyzing DNA), New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. Además, el experto en la materia entenderá que pueden detectarse múltiples alelos variantes en reacciones individuales o en una única reacción (un ensayo "múltiple").

En vista de lo anteriormente expuesto, el experto en la materia entenderá que los métodos de la presente invención pueden ponerse en práctica utilizando una técnica o cualquier combinación de las técnicas bien conocidas que se han indicado anteriormente u otras técnicas conocidas de la técnica.

IV. Ejemplos

El ejemplo siguiente se proporciona a título ilustrativo, pero no limitativo, de la invención reivindicada.

Ejemplo 1. Asociación entre polimorfismos en los genes *RFC-1* y *GGH* y niveles de MTXPG.

El presente ejemplo ilustra que algunos polimorfismos comunes en los genes del portador de folato reducido (*RFC-1*) y de la γ -glutamyl-hidrolasa (*GGH*) son predictivos del nivel de MTXPG en un individuo sometido a terapia de metotrexato (MTX).

10 A. PACIENTES Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio

El estudio fue transversal en tres sitios de investigación (The Center of Rheumatology, Albany NY; Rheumatology Practice, Knoxville TN; Radiant Research, Daytona Beach, FL). Para ser elegibles, los pacientes (≥ 18 años) debían cumplir los criterios revisados de la American Rheumatism Association for Rheumatoid Arthritis y debían haber recibido terapia de dosis baja de TMX durante como mínimo tres meses. Entre otras medicaciones se incluían dosis bajas de corticosteroides (< 10 mg al día) y suplementación con ácido fólico para la prevención de efectos secundarios inducidos por MTX. El consejo de revisión institucional local aprobó el estudio y se obtuvo el consentimiento de cada paciente. Se recogieron los datos demográficos de los pacientes en el momento de inscripción en el estudio. Se extrajo sangre en tubos que contenían EDTA y se transportaron durante la noche a Prometheus Laboratories Inc. (San Diego, CA) para el análisis.

2. Cuantificación mediante HPLC de las concentraciones de MTXPG en los glóbulos rojos

Se midieron las concentraciones de MTXPG en los glóbulos rojos tal como se ha indicado anteriormente, utilizando un procedimiento de HPLC-fluorimetría con una técnica de fotooxidación post-columna (Dervieux *et al.*, Clin. Chem. 49:1632-1641, 2003). Los resultados se expresan en nmoles/l como niveles totales de MTXPG₁₋₅ o niveles totales de MTXG₃₋₅ de cadena larga (es decir, la suma de los niveles de MTXP₃ + MMXP₄ + MTXPG₅).

3. Procedimientos de genotipado

Se extrajo ADN genómico utilizando una columna de captura de generación-purificación (Gentra Systems, Inc., Minneapolis, MN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó el ADN genómico total utilizando un espectrofotómetro Hitachi U-2000 a 260 nm.

El polimorfismo *RFC-1* G80A (que resulta en una sustitución de histidina por arginina en el codón 27 del gen *RFC-1*) se detectó utilizando un método de PCR-PLFR tal como se encuentra descrito (Chango *et al.*, Mol. Genet. Metab. 70:310-315, 2000). La amplificación por PCR se llevó a cabo con 5 ng de ADN genómico en un volumen final de 50 μ l que contenía cebador directo 900 nM (5'-AGT GTC ACC TTC GTC CCC TC-3', SEC ID n° 1), cebador inverso 900 nM (5'-CTC CCG CGT GAA GTT CTT-3', SEC ID n° 2) y mezcla maestra 1X AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones de PCR consistían de una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C seguido de 35 ciclos con desnaturalización durante 15 segundos a 95°C, hibridación/extensión a 60°C durante 1 minuto, con una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Un producto de PCR (20 μ l, amplicón de 230 pb) se sometió a digestión enzimática a 37°C utilizando *CfoI* (Promega, Madison, WI) durante 3 horas. Los individuos con el genotipo de tipo salvaje *RFC-1* 80G/G presentaba tres fragmentos (125, 68 y 37 pb). Los individuos con el genotipo heterocigótico *RFC-1* 80G/A presentaban 4 fragmentos (162, 125, 68 y 37 pb) y aquellos con el genotipo homocigótico *RFC-1* 80A/A presentaban dos fragmentos (162 y 68 pb).

Se detectó el polimorfismo del promotor -401C/T de *GGH* utilizando un método de PCR-PLFR tal como se encuentra descrito (Chave *et al.*, Gene 319:167-175, 2003). Se amplificó un total de 30 ng de ADN genómico utilizando el cebador directo 5'-CGCTGCCTGGTTACCAAAC-3' (SEC ID n° 3) y el cebador inverso 5'-TGTTACGTCGATGTGGACTTCAG-3' (SEC ID n° 4) a una concentración final de 900 nM cada uno en presencia de mezcla maestra 1X AmpliTaqGold. Las condiciones de PCR consistían de una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos con desnaturalización durante 15 segundos a 95°C, hibridación/extensión a 60°C durante 1 minuto, con una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Un producto de PCR (20 μ l, amplicón de 109 pb) se sometió a digestión enzimática a 55°C utilizando *BsII* (New England Biolabs, Beverly, MA) durante 3 horas a toda la noche, según resultase apropiado. Los individuos con el genotipo de tipo salvaje *GGH*-401C/C presentaban un fragmento (109 pb), los individuos con el genotipo heterocigótico *GGH*-401C/T presentaban tres fragmentos (109, 61 y 48 pb) y aquellos con el genotipo homocigótico *GGH*-401T/T presentaban dos fragmentos (61 y 48 pb).

4. Análisis estadísticos

El análisis estadístico consistió de una regresión lineal o logística multivariante con los niveles de MTXPG (es decir, MTXPG₁₋₅ y MTXPG₃₋₅) como variables dependientes y los predictores (es decir, la edad, la dosis semanal de MTX, la vía de administración y los genotipos de RFC-1 y de GGH) como variables independientes. Para calcular un índice farmacogenético, los genotipos se dividieron en mutantes homocigóticos (*RFC-1* 80A/A y *GGH* -401T/T, valor de 1) y de tipo salvaje o heterocigóticos (*RFC-1* 80G/G ó 80G/A y *GGH* -401C/C ó 401C/T, valor de 0), según resultase apropiado. Las comparaciones entre grupos se llevaron a cabo utilizando el ANOVA de Kruskal-Wallis. La probabilidad de que los niveles de MTXPG fueran superiores a la mediana del grupo se derivó a partir del modelo de regresión logística. El cociente de probabilidades (CP) y la probabilidad (P) se proporcionan con un intervalo de confianza (IC) al 95%. Las estimaciones se proporcionan con barras de error estándar.

B. RESULTADOS

Se incluyó un total de 226 pacientes entre diciembre de 2002 y noviembre de 2003 de tres sitios diferentes de los Estados Unidos, que habían sido sometidos a terapia de MTX durante más de 3 meses. La mediana de la dosis semanal de MTX administrada era de 15 mg. Un total de 184 pacientes (el 81%) recibió suplementación de ácido fólico, y 107 pacientes (el 47%) recibían dosis bajas concomitantes de corticoesteroides. La mediana del nivel total de MTXPG₁₋₅ era de 102 nmoles/l y la mediana del nivel de MTXPG₃₋₅ de cadena larga era de 56 nmoles/l. La frecuencia alélica era de 43% para *RFC-1* 80A y de 33% para *GGH*-401T. Se resumen los datos demográficos de los pacientes en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos demográficos de los pacientes

Parámetro	Valor
Edad (años)	66 (26-91)
Tiempo bajo terapia de MTX (meses)	51 (3-279)
Dosis semanal de MTX (mg)	15 (5-25)
Niveles totales de MTXPG (MTXPG ₁₋₅ , nmoles/l)	102 (<5-358)
Niveles totales de MTXPG de cadena larga (MTXPG ₃₋₅ , nmoles/l)	56 (<5-224)
Polimorfismo de <i>RFC-1</i> G80A	80G/G n=70 (31) 80G/A n=121 (54) 80A/A n=35 (15)
Polimorfismo de <i>GGH</i> -401CT	-401C/C n=112 (50) -401C/T n=78 (35) -401T/T n=36 (16)
Para las variables cuantitativas (edad, tiempo bajo terapia de MTX, dosis semanal de MTX, nivel total de MTXPG y niveles de cadena larga de MTXPG), se muestra la mediana del valor con el intervalo de valores entre paréntesis. Los genotipos de <i>RFC-1</i> y de <i>GGH</i> se expresan como el número (n) de individuos que presenta un genotipo particular con el porcentaje correspondiente entre paréntesis.	

1. Regresión lineal y logística multivariantes de las concentraciones de MTXPG

Un análisis de regresión lineal multivariante reveló que los niveles totales de MTXPG₁₋₅ y de MTXPG₃₋₅ de cadena larga eran predichos significativa e independientemente por la edad (p<0,001), la dosis semanal de MTX (p<0,001) y la vía de administración (p<0,04) (ver la Tabla 2). Los pacientes de más edad presentaban concentraciones de MTXPG más altas, mientras que el MTX inyectado resultaba en niveles de MTXPG más altos que con la administración oral. Aunque los niveles de MTXPG no eran predichos significativamente por el número de alelos de *RFC-1* 80A (estimación de MTXPG₁₋₅=6,3 ± 5,4, p=0,24; estimación para MTXPG₃₋₅=6,0 ± 4,8, p=0,21) o por el número de alelos de *GGH* -401T (estimación de MTXPG₁₋₅=-3,7 ± 3,4, p=0,31; estimación de MTXPG₃₋₅=-5,9 ± 3,3, p=0,07), la homocigosidad de *RFC-1* 80A/A en comparación con pacientes con el genotipo *RFC-1* 80G/G ó 80G/A resultó en niveles incrementados de MTXPG (p<0,033), y la homocigosidad de *GGH* -401T/T en comparación con los pacientes con el genotipo *GGH* -401C/ ó -401C/T resultó en niveles reducidos de MTXPG (p<0,025) (ver la Tabla 2). Los análisis de gráficos de dispersión de valores predichos versus observados para las concentraciones de MTXPG₁₋₅ y MTXPG₃₋₅ se ilustran en las figuras 2A y 2B, respectivamente. La administración concurrente de folato y/o corticoesteroides no predecía los niveles de MTXPG (p>0,70).

Tabla 2. Regresión lineal multivariante de las concentraciones de MTXPG en glóbulos rojos

	R ² global	Intersección con eje y	Edad	Dosis de MTX	Vía de admin.	<i>RFC</i> -180A/A	<i>GGH</i> -401T/T
MTXPG ₁₋₅ (nmoles/l)	0,32	-103616	2,47±029 p<0,001	4,95±0,78 p<0,001	16,2±8,0 p=0,04	20,8±9,7 p=0,033	21,0±9,6 p=0,029
MTXPG ₃₋₅ (nmoles/l)	0,38	-120624	1,53±0,20 p<0,001	439±0,53 p<0,001	15,6±5,4 p=0,004	14,8±6,6 p=0,025	-15,3±6,5 p=0,018
Se proporcionan los parámetros de regresión para variables independientes para MTXPG ₁₋₅ y MTXPG ₃₋₅ . La ecuación multivariante era la siguiente: MTXPG (nmoles/l) = intersección con eje y + (β ₁ x Edad) + (β ₂ x Dosis)							

+ ($\beta_3 \times$ Vía de adm.+ ($\beta_4 \times$ genotipo de *RFC-1*) + ($\beta_5 \times$ genotipo de *GGH*). Las variables independientes eran: edad (en años), dosis de MTX (mg/semana), vía de administración de MTX (0: oral; 1: inyectado); presencia del genotipo *RFC-1* 80A/A (0: 80G/G ó 80G/A; 1: 80A/A) y presencia del genotipo *GGH* -401T/T (0: -401C/C ó -401C/T; 1: -401T/T). Las estimaciones (β) se proporcionan con los SEM.

Tras el ajuste para las variables concomitantes, los pacientes con el genotipo *GGH*-401T/T presentaban una probabilidad 4,8 veces superior (CP IC al 95%: 1,8-13,0, $p=0,007$) de presentar un nivel de MTXPG₃₋₅ inferior a la mediana del grupo que los pacientes con el genotipo *GGH*-401C/C ó -401C/T. A la inversa, aquellos con el genotipo *RFC-1* 80A/A (CP IC al 95%: 1,4-8,4, $p<0,001$) presentaban una probabilidad 3,4 veces superior de presentar niveles de MTXPG₃₋₅ superiores a la mediana del grupo que aquellos pacientes con el genotipo *RFC-1* 80G/G ó 80G/A.

2. Índice farmacogenético para determinar los niveles de MTXPG

Puede calcularse un índice farmacogenético (IF) para determinar los niveles de MTXPG de la manera siguiente: (1) se asigna un valor de 1 al gen *RFC-1* en el caso de que se encuentre presente un genotipo homocigótico 80A/A de *RFC-1*, o un valor de 0 en el caso de que se encuentre presente un genotipo de tipo salvaje 80G/G de *RFC-1* ó heterocigótico 80G/A; (2) se asigna un valor de 1 al gen *GGH* en el caso de que se encuentre presente un genotipo homocigótico de *GGH*-401T/T o un valor de 0 en el caso de que se encuentre presente un genotipo de tipo salvaje, *GGH*-401C/C o heterocigótico, *GGH*-401C/T, y (3) se resta el valor asignado al gen *GGH* del valor asignado al gen *RFC-1* (es decir, valor de *RFC-1* - valor de *GGH*).

Debido a la contribución opuesta de la homocigosidad de alelos variantes de *RFC-1* 80A/A y *GGH*-401T/T a los niveles intracelulares de MTXPG (estimaciones $\sim \pm 15$ para MTXPG₃₋₅, Tabla 2), los pacientes con ambos genotipos homocigóticos, *RFC-1* 80A/A y *GGH*-401T/T (5 pacientes), se agruparon con los pacientes que no presentaban ninguno de los genotipos homocigóticos (160 pacientes). Bajo estas condiciones, un total de 31 pacientes presentaba un índice de -1 (es decir, aquellos con el genotipo homocigótico *GGH*-401T/T únicamente), 165 pacientes presentaban un índice de 0 (es decir, aquellos que no presentaban ninguno de los genotipos homocigóticos o aquellos que presentaban ambos genotipos homocigóticos) y 30 pacientes presentaban un índice de 1 (es decir, aquellos con el genotipo homocigótico *RFC-1* 80A/A únicamente).

En un análisis sin ajustes para edad, dosis y vía de administración, se observó una relación significativa entre valor de IF incrementado y niveles intracelulares incrementados de MTXPG (Kruskal-Wallis, $p<0,057$) (figura 3A). Además, el IF se encontraba asociado a niveles incrementados de MTXPG₅ ($p<0,001$), a niveles incrementados de MTXPG₄ ($p=0,035$) y a niveles incrementados de MTXPG₃ ($p=0,027$), aunque no se observaron diferencias significativas en los niveles de MTXPG₂ y de MTXPG₁ ($p>0,70$) (figura 3B). En un análisis de regresión lineal multivariante con ajustes para concomitancia, el IF predijo significativa e independientemente las concentraciones de MTXPG₁₋₅ (estimación= $15,5 \pm 4,6$, $p=0,002$; R^2 global= $0,32$) y MTXPG₃₋₅ (estimación= $20,9 \pm 6,7$, $p=0,001$, R^2 global= $0,38$). Otras estimaciones de corte con el eje y, edad, dosis de MTX y vía de administración fueron similares a las presentadas en la Tabla 2.

Finalmente, en un análisis de regresión logística multivariante, se observó una relación significativa entre el valor incrementado de IF y una probabilidad incrementada de niveles de MTXPG₃₋₅ superiores a la mediana ($p<0,001$). La figura 4 ilustra la probabilidad de que un paciente presente niveles de MTXPG₃₋₅ superiores a la mediana comparado con un valor de IF dado.

C. COMENTARIO

Varios ensayos clínicos bien controlados han demostrado que el MTX reduce la discapacidad funcional, observándose el efecto máximo tras aproximadamente 6 meses de terapia (Weinblatt *et al.*, N. Engl. J. Med. 312:818-822, 1985; Weinblatt *et al.*, Arthritis Rheum., 37:1492-1498, 1994). Sin embargo, resultados recientes de una cohorte de gran tamaño de pacientes con artritis reumatoide han demostrado recientemente que el tiempo para maximizar los efectos del MTX de hecho es más prolongado de lo que se creía inicialmente, planteando de esta manera que la dosis de MTX podría ser subóptima (Ortendahl *et al.*, J. Rheumatol. 29:2084-2091, 2002). Previamente se ha demostrado que los niveles de MTXPG en glóbulos rojos (GR) podrían estar asociados a la respuesta terapéutica al MTX, indicando que el seguimiento rutinario de la terapia de MTX utilizando los niveles de MTXPG podría resultar útil para optimizar la terapia (Dervieux *et al.*, Arthritis Rheum. 50:2766-2774, 2004). El presente estudio ilustra que los polimorfismos comunes en *RFC-1* y *GGH* son predictivos de los niveles *in vivo* de MTXPG en GR en una población de gran tamaño de pacientes tratados con una dosis baja de MTX.

El presente estudio era un estudio multicéntrico en el que todos los pacientes habían estado bajo terapia de MTX durante más de tres meses. Se utilizó un modelo de regresión multivariante para predecir los niveles de MTXPG en eritrocitos (es decir, GR). Para el análisis, las variables independientes eran: edad, dosis de MTX, vía de

- administración y genotipos de *RFC-1* y *GGH*. En primer lugar, el análisis reveló que las dosis más altas de MTX resultaban en niveles más altos de MTXPG. En segundo lugar, el MTX inyectado produjo niveles de MTXPG más altos que el MTX oral, lo que resulta consistente con observaciones previas de que el MTX inyectado se asocia a una biodisponibilidad incrementada en comparación con la administración oral (Hamilton *et al.*, Br. J. Rheumatol. 36:86-90, 1997; Kurnik *et al.*, Aliment. Pharmacol. Ther. 18:57-63, 2003). Sin embargo, el resultado de que los pacientes de más edad presentaban niveles más altos de MTXPG debe interpretarse con cuidado, ya que una reducción de la eliminación renal de MTX en pacientes de más edad podría resultar en una biodisponibilidad incrementada del MTX y, de esta manera, en niveles intracelulares incrementados de MTXPG.
- 5
- 10 Algunos resultados recientes sugieren que un polimorfismo de G80A en *RFC-1* se asocia a niveles alterados de folato/antifolato y modestamente con el riesgo de un defecto del tubo neural (Chango *et al.*, Mol. Genet. Metab. 70:310-315, 2000; Shaw *et al.*, Am. J. Med. Genet. 108:1-6, 2002; Morin *et al.*, Mol. Genet. Metab. 79:197-200, 2003). Además, los datos sugieren que los individuos con el genotipo mutante homocigótico de *RFC-1* 80A/A tienden a presentar niveles plasmáticos más altos de folato y metotrexato (Laverdiere *et al.*, Blood 100:3832-3834, 2002; Chango *et al.*, supra, 2000) y niveles de poliglutamato de folato en glóbulos rojos más altos que aquellos de tipo salvaje o genotipo heterocigótico (Shaw *et al.*, supra, 2002). Este último resultado es consistente con la observación del presente estudio de que la homocigosidad *RFC-1* 80A/A era predictiva de niveles incrementados de MTXPG.
- 15
- 20 Los datos *in vitro* previos han demostrado que un polimorfismo -401CT en el promotor de *GGH* se asocia a actividad de luciferasa incrementada, indicando que el polimorfismo podría resultar en una actividad incrementada de *GGH* y una desconjugación incrementada de MTXPG (Chave *et al.*, Gene 319:167-175, 2003). Este resultado es consistente con la observación del presente estudio de que los pacientes con el genotipo *GGH*-401T/T presentaban una poliglutamación de MTX reducida en comparación con aquellos con el genotipo -401C/C ó -401C/T. Debido a que existía una contribución opuesta de los genotipos *RFC-1* 80A/A y *GGH* -401T/T a los niveles de MTXPG, se calculó un IF compuesto que incluía este doble efecto, y los pacientes con ambos genotipos homocigóticos, *RFC-1* 80A/A y *GGH* -401T/T, se agruparon con los que no presentaban ninguno de estos genotipos homocigóticos. Bajo estas condiciones, el análisis reveló que el IF se asociaba fuertemente a los niveles de MTXPG, apoyándose la idea de que la suma de las contribuciones de los componentes genotípicos individuales presenta el potencial de maximizar la expresión fenotípica en el contexto de polimorfismos genéticos de baja penetrancia.
- 25
- 30 En términos prácticos, puede utilizarse el IF para identificar los pacientes con una mayor probabilidad de éxito con la terapia de MTX (es decir, aquellos con un IF de 1) y aquellos que requerirán dosis de MTX más agresivas (por ejemplo aquellos con IF de -1). Evidentemente los marcadores genéticos adicionales en los loci asociados a la entrada o salida de MTX (por ejemplo proteínas de resistencia a múltiples fármacos (PRM)), poliglutamación (por ejemplo folilpoliglutamato sintetasa (FPGS)) y/o catabolismo (por ejemplo la aldehído oxidasa) también podrían contribuir a la farmacocinética del fármaco (Ranganathan *et al.*, Ann. Rheum. Dis. 62:4-9, 2003; Zeng *et al.*, Cancer 61:7225-7232, 2001; Lee *et al.*, J. Natl. Cancer 92:1934-1940, 2000).
- 35
- 40 En conclusión, el presente estudio indica que pueden utilizarse las pruebas farmacogenéticas para determinar los niveles de MTXPG e individualizar la dosis de MTX para maximizar los efectos terapéuticos.

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la eficacia de una terapia de metotrexato para un individuo que presenta una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria, comprendiendo dicho método:
- 5 determinar para el individuo la presencia o ausencia de un genotipo predictivo del nivel de poliglutamatos de metotrexato (MTXPG) en linfoblastos o eritrocitos durante dicha terapia de metotrexato, comprendiendo dicho genotipo una variación homocigótica -401 C por T en el promotor del gen γ -glutamyl-hidrolasa (*GGH*), comprendiendo además dicho genotipo una variación homocigótica 80G por A en el gen del portador de folato reducido (*RFC-1*) *SLC19 A1*, y
- 10 generando un índice farmacogenético para el individuo en el gen *GGH* y en el gen *RFC-1*, en el que el índice farmacogenético es indicativo del nivel de MTXPG en el individuo.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el índice farmacogenético se calcula como la suma o la diferencia entre el número de alelos variantes homocigóticos en el promotor del gen *GGH* y el gen *RFC-1*.
- 15 3. Método según la reivindicación 1, en el que la generación del índice farmacogenético comprende asignar a cada uno del gen *RFC-1* y el gen *GGH*, (a) un primer valor en el caso de que el individuo sea de tipo salvaje o heterocigótico para la variación, o (b) un segundo valor en el caso de que el individuo sea homocigótico para la variación, y calcular el índice farmacogenético a partir del primer y el segundo valores.
- 20 4. Método según la reivindicación 3, en el que el cálculo comprende restar el valor asignado al gen *GGH* del valor asignado al gen *RFC-1*.
5. Método según la reivindicación 1, en el que se determina la eficacia mediante el cálculo de un nivel de MTXPG utilizando el análisis de regresión lineal multivariante.
- 25 6. Método según la reivindicación 5, en el que el nivel de MTXPG comprende MTXPG₁₋₅ ó MTXPG₃₋₅.
7. Método según la reivindicación 6, en el que el nivel de MTXPG₁₋₅ se determina basándose en dicho genotipo y por lo menos otro factor seleccionado de entre el grupo que consiste de las dosis de metotrexato obtenidas de dicho individuo, la vía de administración de dichas dosis de metotrexato y la edad de dicho individuo.
- 30 8. Método según la reivindicación 6, en el que el nivel de MTXPG₃₋₅ se determina basándose en dicho genotipo y por lo menos otro factor seleccionado de entre el grupo que consiste de las dosis de metotrexato obtenidas de dicho individuo, la vía de administración de dichas dosis de metotrexato y la edad de dicho individuo.
- 35 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho individuo presenta artritis reumatoide.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho individuo presenta lupus eritematoso sistémico.
- 40 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha terapia de metotrexato es terapia de dosis baja de metotrexato.
12. Método según la reivindicación 1, en el que dicho genotipo se determina con una muestra de ácidos nucleicos obtenida a partir de sangre completa.
- 45 13. Método según la reivindicación 1, en el que dicho genotipo se determina mediante un método que comprende PCR, secuenciación de ácidos nucleicos, polimorfismo de longitudes de fragmentos de restricción (PLFR), ensayo de movilidad de heterodúplex (EMH) o electroforesis en gradiente de gel desnaturante (EGGD).
- 50 14. Método según la reivindicación 11, que comprende además determinar una dosis efectiva de terapia de metotrexato para dicho individuo.

55

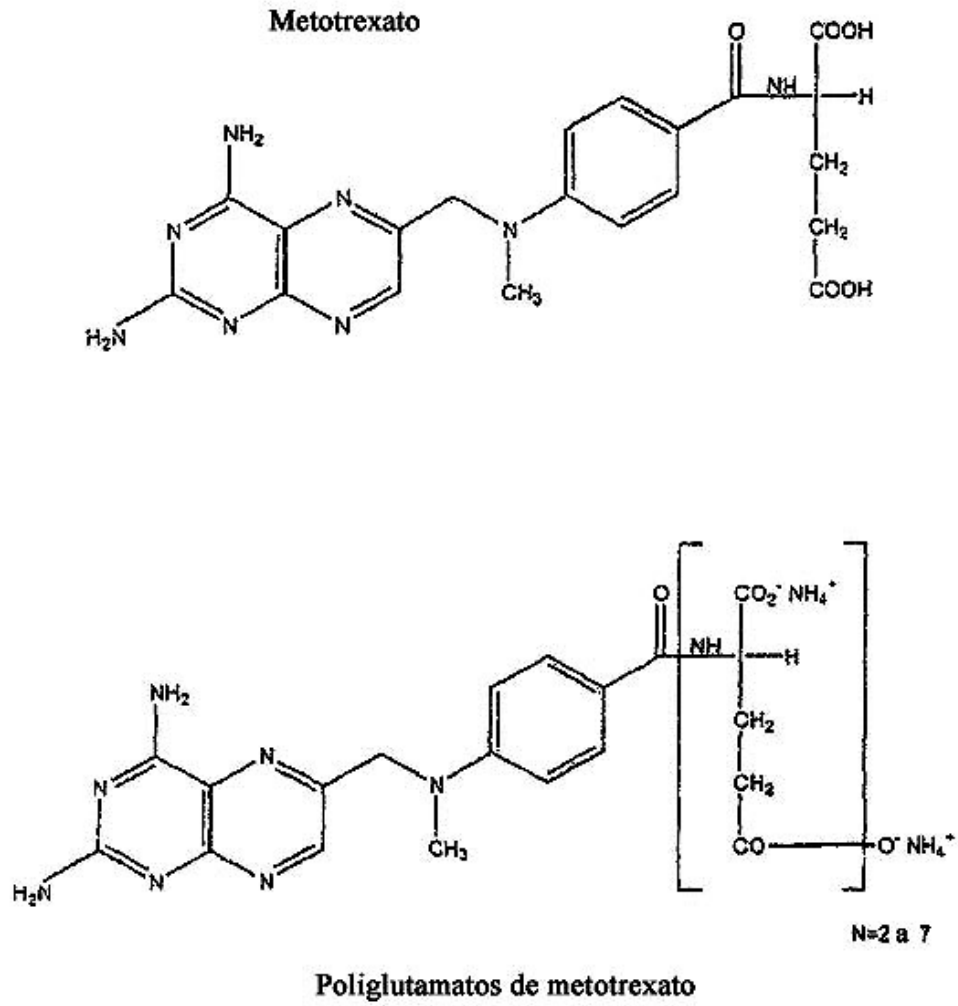


FIG. 1

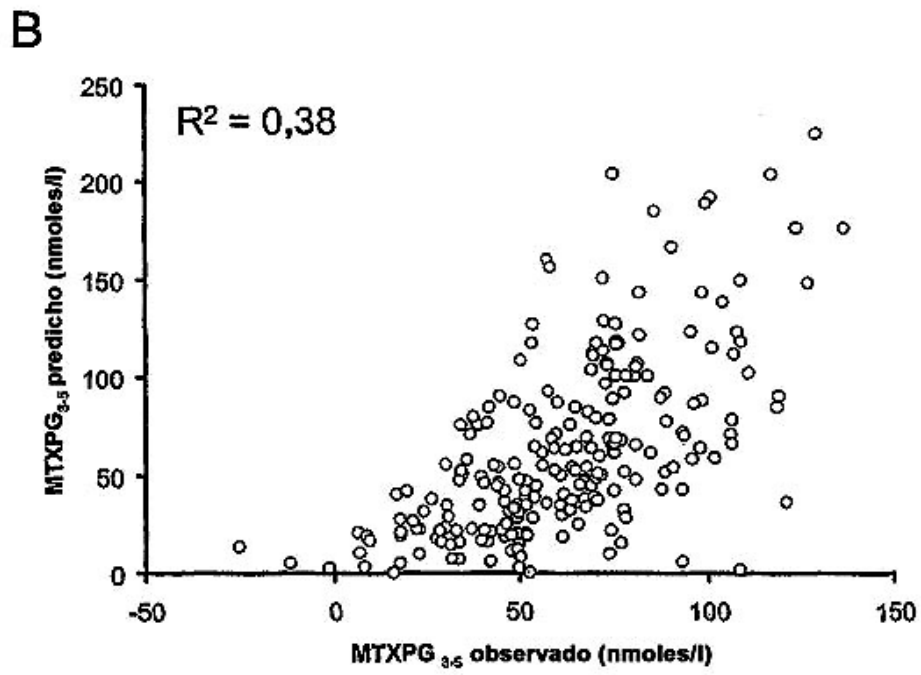
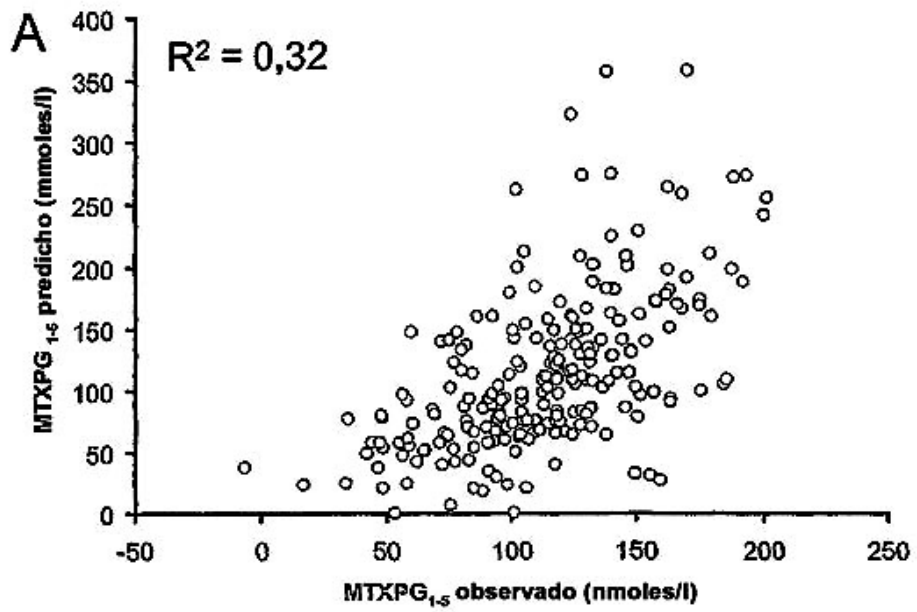


FIG. 2

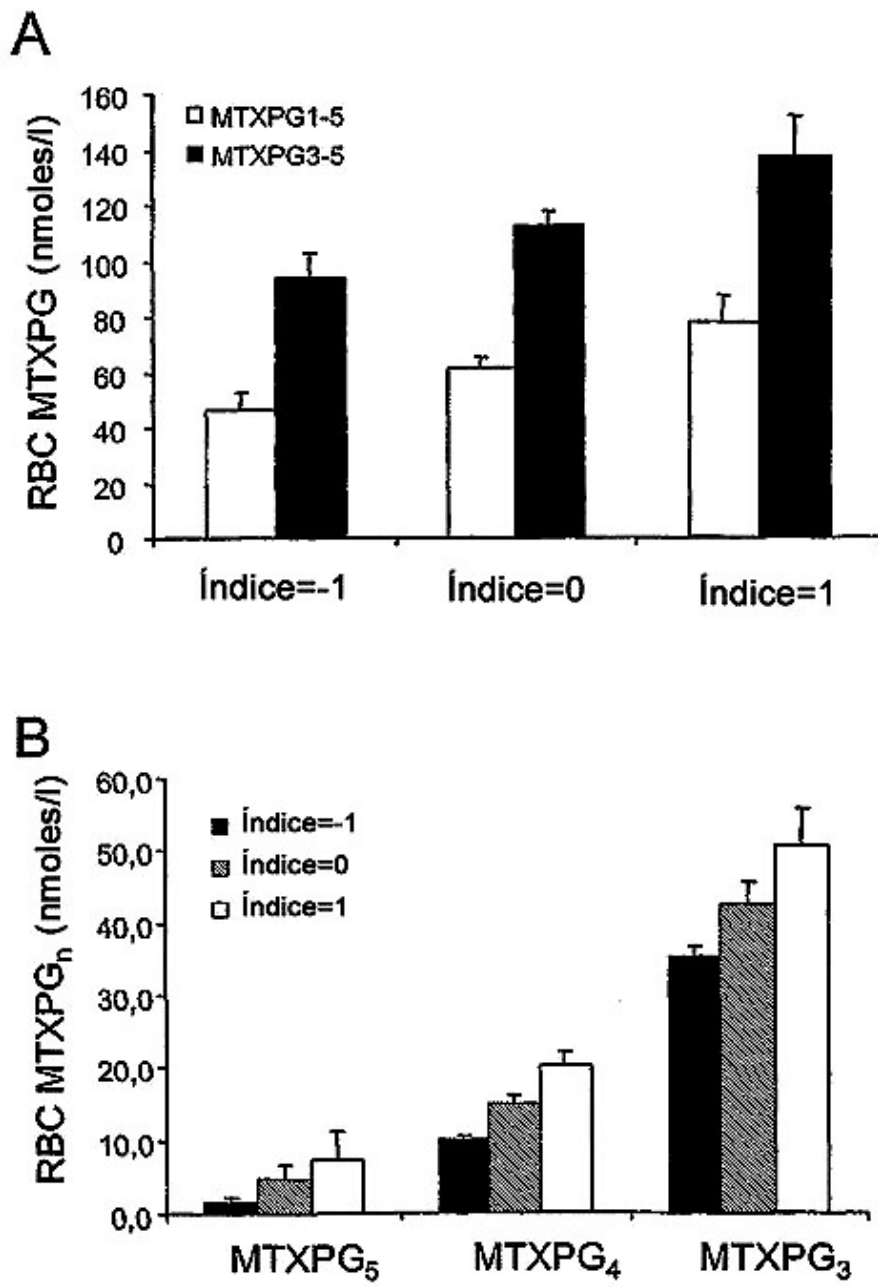


FIG. 3

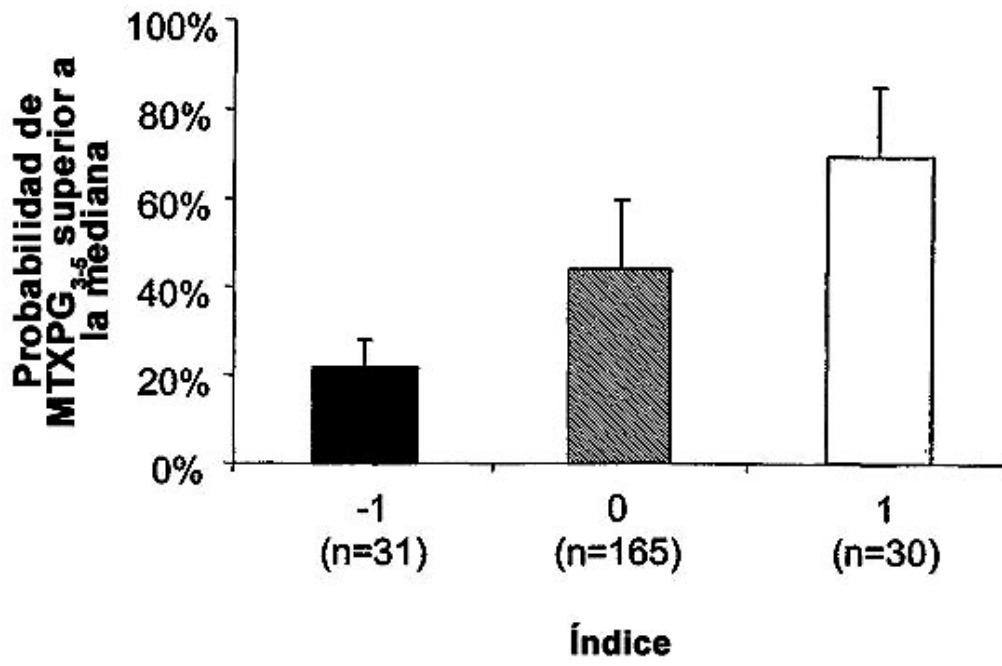


FIG. 4