

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 292**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2008 E 12179739 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 2522753**

54 Título: **Modulación por IVIG de quimioquinas para el tratamiento de la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson**

30 Prioridad:

13.08.2007 US 955610 P

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

16.07.2014

73 Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)

**One Baxter Parkway
Deerfield, IL 60015, US y**

BAXTER HEALTHCARE S.A. (50.0%)

72 Inventor/es:

**REIPERT, BIRGIT;
EHRlich, HARTMUT;
SCHWARZ, HANS-PETER y
ELOVAARA, IRINA**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 477 292 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

Modulación por IVIG de quimioquinas para el tratamiento de la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad autoinmune inflamatoria más habitual del sistema nervioso central. Se caracteriza por lesiones desmielinizantes de la sustancia blanca del sistema nervioso central, cuyas consecuencias son déficits neurológicos (Sospedra M. y Martin R., *Immunology of Multiple Sclerosis. Annu Rev Immunol.*, 23: 683-747 (2005)). La patogénesis de la enfermedad está asociada con la infiltración en el cerebro de células inmunes y, especialmente, de células T activadas (Sospedra M. y Martin R., *Annu Rev Immunol.*, 23: 683-747 (2005)). Esta infiltración va acompañada de una disrupción de la barrera hematoencefálica (van Horssen J. y col., *J Neuropathol Exp Neurol.*, 66: 321-8 (2007)).

10 Las inmunoglobulinas intravenosas (IVIG) han demostrado ser efectivas en el tratamiento de diversas enfermedades autoinmunes, incluyendo EM (Sospedra M. y Martin R., *Immunology of Multiple Sclerosis. Annu Rev Immunol.*, 23: 683-747 (2005)), pero no se ha conseguido explicar por completo el mecanismo exacto de acción que subyace bajo la actividad inmunomoduladora de las IVIG. Existen diversos modelos que tratan de explicar la eficacia de las IVIG en pacientes que padecen enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Kazatchkine M.D. y col., *Mult Scler.*, 2:24-6; 33:24-26 (2000); Trebst C. and Stange M., *Curr. Pharm. Design.*, 12:241-2493 (2006)). Estos modelos incluyen la inmunomodulación mediada por los receptores Fcγ (Sorensen P.S., *Neurol Sci.*, 4:227-230 (2003)), la modulación de las redes idiotipo-antiidiotipo (Samuelsson A. y col., *Science*, 291:484-6 (2001)), la eliminación de productos microbianos inmunoestimulantes (Dalakas M.C., *Ann Intern Med.*, 126:721-30 (1997)) y la neutralización de los anticuerpos que actúan contra las citoquinas y quimioquinas (Bayry J. y col., *Transfus Clin Biol.*, 10:165-9 (2003)). También se ha demostrado el potencial de las IVIG para modificar el equilibrio entre la inmunoreactividad de las células Th1 y Th2 e inhibir la formación de complejos anticuerpo/complemento (Andersson U. y col., *Immunol Rev.*, 139: 21-42 (1994); Bayry J. y col., *Intravenous immunoglobulin in autoimmune disorders: An insight into the immunoregulatory mechanisms*).

15 Los efectos beneficiosos de las IVIG en pacientes que padecen EM fueron demostrados mediante una serie de ensayos clínicos abiertos (Basta M. y col., *Blood*, 77: 376-80 (1991)) y mediante cuatro ensayos clínicos aleatorios doble ciego (Sorensen P.S. y col., *Eur J. Neurol.*, 9: 557-563 (2002); Strasser-Fuchs S. y col., *Mult Scler.*, 2: 9-13 (2000); Sorensen P.S. y col., *Neurology*, 50: 1273-1281 (1998); Lewanska M. y col., *Eur J. Neurol.*, 9: 565-572 (2002)). Las IVIG redujeron la frecuencia de recaída en pacientes de EM, así como el número de lesiones realizadas con gadolinio observadas en el diagnóstico por imagen de resonancia magnética (MRI) (Dudesek A. y Zettl U.K., *J. Neurol.*, 253: V/50-V/58)). Asimismo, se demostró que la IVIG suprimía la proliferación de las células T periféricas activadas (Bayry J. y col., *Neurol Sci.*, 4: 217-221 (2003); Stange M. y Gold R., *Nervenarzt.* (2005)). Las células T periféricas auto-reactivas pueden atravesar la barrera hematoencefálica y se cree que son las principales células efectoras responsables de la inflamación cerebral (Sospedra M. y Martin R., *Annu Rev Immunol.*, 23: 683-747 (2005); Helling N. y col., *Immunol Res.* 1: 27-51 (2002)). Por tanto, una modulación de la función cerebral T mediante IVIG podría explicar el efecto beneficioso desde el punto de vista terapéutico de las IVIG observado en los pacientes de EM.

20 Recientemente se ha observado que las IVIG son un tratamiento alternativo eficaz para aquellos pacientes que sufren esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR) (Elovaara I. y col., *Intravenous Immunoglobulin is effective and well tolerated in the treatment of MS Relapse*, manuscript submitted). Debido a que se cree que las células T periféricas auto-reactivas son las responsables de la inflamación cerebral en la EM, se asume la tarea de identificar los genes que están regulados de forma diferencial en las células T periféricas de pacientes con EM en grado de exacerbación aguda tratados con IVIG. Se llegó a la conclusión de que las diferencias en los perfiles de expresión génica podrían facilitar información importante sobre los potenciales mecanismos de acción del tratamiento con IVIG.

Además, los cambios observados en los perfiles de expresión génica podrían facilitar marcadores de pronóstico que predijesen el éxito del tratamiento. Dichos marcadores podrían también ayudar a identificar los objetivos de desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

25 El documento WO 02/059604 se refiere a métodos y composiciones para la detección, diagnóstico y pronóstico de la esclerosis múltiple, así como para controlar la eficacia de diversos tratamientos. El documento WO 02/059604 también se refiere a la identificación de aquellos pacientes con una mayor probabilidad de respuesta a un tratamiento terapéutico específico.

El documento WO 2005/027733 se refiere a marcadores biológicos de la esclerosis múltiple y a su utilización para el diagnóstico y aplicaciones clínicas de la enfermedad.

Asimismo, un número cada vez mayor de evidencias sugieren que la inflamación cerebral tiene una función específica no sólo en el caso de la EM, sino también en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (véase, por ejemplo, Wilms y col., *Curr. Pharm. Des.* 13: 1925 (2007)). En microglías específicas, las células inmunes innatas residentes desempeñan un papel principal en los procesos inflamatorios del cerebro y se sabe que están asociadas no sólo a la EM, sino también a la Enfermedad de Alzheimer y la Enfermedad de Parkinson (véanse, por ejemplo, Yamamoto y col., *Am. J. Pathology* 166: 1475 (2006); Huang y col., *FASEB* 19: 761 (2005); Kim y col., *Exp. And Mol. Med.* 38: 333 (2006)). Así, la presente invención proporciona nuevos marcadores de pronóstico que predicen el éxito del tratamiento asociado a la administración de un tratamiento con inmunoglobulina por vía intravenosa, así como nuevas dianas terapéuticas que pueden utilizarse para el tratamiento de la EM, por ejemplo esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR), o de la enfermedad de Parkinson o de Alzheimer.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona métodos para estudiar la eficacia del tratamiento de la esclerosis múltiple según la reivindicación 1.

El reactivo puede ser un ácido nucleico, incluyendo un oligonucleótido o un conjunto de cebadores de RT-PCR. En otros aspectos, la muestra es una muestra de sangre que puede contener células T. La muestra puede ser también líquido cerebrospinal.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1: muestra el desarrollo de las puntuaciones EDSS en 10 pacientes de EMRR durante el tratamiento con IVIG. Los trazos de los recuadros, que contienen la mediana, los percentiles 25 y 75, la mínima y la máxima, muestran las puntuaciones EDSS de los pacientes durante la remisión, así como antes y después del tratamiento con IVIG durante la fase de relapso.

Figura 2: muestra que el tratamiento con IVIG no altera la composición celular de células obtenidas por aislamiento de ARN. Se muestran los datos de expresión génica relativa obtenidos por análisis de microarray para CD3, CD4, CD8 y CD14. A la expresión génica se asigna el día 0 el valor 1 y se compara con la expresión génica el día 6 (A) y el día 26 (B). Cada punto representa un paciente individual.

Figura 3: PCR en tiempo real, mostrando la expresión de genes representativos. Los gráficos de los recuadros contienen la mediana, los percentiles 25 y 75, la mínima y la máxima, muestran la expresión relativa de los genes indicados. La expresión génica se normalizó con respecto a un control endógeno (gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa). Los experimentos PCR en tiempo real se llevaron a cabo en tripletes, confirmando al menos en dos ocasiones en diferentes días.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

En términos generales, la esclerosis múltiple (EM) se refiere a una enfermedad inflamatoria desmielinizante que afecta al sistema nervioso central (SNC). Durante la evolución de la EM, la mielina que rodea los axones neuronales se degenera, lo que resulta en una subsecuente degeneración axonal. Se cree que la patogénesis de la EM implica una respuesta autoinmune en la cual las células T atacan partes del sistema nervioso central, desencadenando respuestas inflamatorias, resultando en una estimulación de otras células inmunes y en la secreción de factores solubles tales como citoquinas y anticuerpos. Los procesos inflamatorios desencadenados por las células T generan fugas en la barrera hematoencefálica, formada por células endoteliales. A su vez, estas fugas en la barrera hematoencefálica generan otros efectos perjudiciales, como inflamación cerebral, activación de macrófagos y secreción adicional de citoquinas y otras proteínas proteolíticas, como metaloproteinasas de matriz. El resultado final de estos procesos patológicos es la desmielinización neuronal (véase, por ejemplo, Calabresi, P.A., *American Family Physician*, 70: 1935-1944 (2004)).

A medida que avanza la EM, gradualmente se produce una desmielinización y una transección de los axones neuronales en placas en el cerebro y la médula espinal. Por ello, el término esclerosis múltiple se refiere a las múltiples cicatrices (o esclerosis) que se encuentran en el recubrimiento de mielina de los pacientes afectados. Esta cicatrización causa síntomas que pueden variar ampliamente en función del alcance de las cicatrices y de los circuitos neuronales que se han visto interrumpidos.

Entre los síntomas y manifestaciones de la EM se incluyen alteraciones de la sensibilidad (hipoestesia), debilidad muscular, espasmos musculares anormales, dificultades en el movimiento; dificultades de coordinación y equilibrio (ataxia); trastornos del habla (disartria) o de la deglución (disfagia), problemas visuales (nistagmo, neuritis óptica o diplopía), fatiga y síndrome doloroso agudo o crónico, trastornos de la vejiga o los intestinos, trastornos cognitivos o sintomatología emocional (por ejemplo, depresión).

- 5 Los síntomas iniciales más comunes comunicados son: trastornos de la sensibilidad en brazos, piernas o rostro (33%), pérdida de visión total o parcial (neuritis óptica) (16%), debilidad (13%), visión doble (7%), inseguridad al caminar (5%) y problemas de equilibrio (3%) (véase Navarro y col., Rev Neurol 41: 601-3 (2005); Jongen P., J. Neurol Sci 245: 59-62 (2006)). En algunos pacientes, el ataque inicial de EM viene precedido de una infección, trauma o de un esfuerzo físico extenuante.
- 10 En la actualidad se utilizan diversos tests diagnósticos para diagnosticar la EM. Estos tests incluyen la presentación clínica de dos episodios independientes de síntomas neurológicos característicos de la EM, junto con el descubrimiento de anormalidades consistentes en el examen físico. Alternativamente, a menudo se utiliza el diagnóstico por imagen de resonancia magnética (MRI) del cerebro y de la columna para evaluar aquellos individuos sospechosos de padecer EM. La MRI revela zonas de desmielinización y lesiones brillantes en las imágenes T2-ponderadas o en secuencias FLAIR (recuperación de inversión atenuada por líquido). Puede utilizarse un contraste de Gadolinio para mostrar las placas activas en las imágenes T1-ponderadas.
- 15 Comprobar el líquido cerebroespinal (CSF) puede aportar evidencias de inflamación crónica del sistema nervioso central, una característica de la EM. En tales pruebas se comprueba la existencia de bandas oligoclonales en el CSF, que son inmunoglobulinas encontradas en una proporción entre el 85% y el 95% de los individuos que padecen EM definida. Cuando se combina con una MRI y con los datos clínicos, la presencia de bandas oligoclonales puede ayudar a elaborar un diagnóstico definido de EM.
- 20 Debido a que el cerebro de los individuos afectados por EM suele responder de forma menos activa a la estimulación del nervio óptico y de los nervios sensoriales, también se puede utilizar la medida de dichas respuestas cerebrales como herramienta de diagnóstico. Estas respuestas cerebrales pueden examinarse utilizando potenciales visuales evocados (VEP) y potenciales somatosensoriales evocados (SEP). La disminución de la actividad en cualquiera de los tests puede revelar una desmielinización, que de otro modo podría resultar asintomática. Junto con otros datos, estos exámenes podrían ayudar a desvelar la amplia implicación nerviosa para un diagnóstico definido de EM.
- 25 Se han descrito diversos subtipos o patrones de progresión de la EM. En 1996, la United States National Multiple Sclerosis Society normalizó las cuatro siguientes definiciones de subtipo, como se describe seguidamente.
- 30 La EM recurrente-remitente (EMRR) se refiere a un subtipo caracterizado por ataques impredecibles (relapsos) seguidos por períodos de meses o años de relativa calma (remisión) donde no se dan nuevos signos de actividad de la enfermedad. Los déficits sufridos durante los ataques pueden resolverse o adquirir carácter permanente. La recurrencia-remisión describe el curso inicial del 85% al 90% de los individuos con EM.
- La EM secundaria progresiva se describe aproximadamente en el 80% de las personas con EM recurrente-remitente inicial, que posteriormente empiezan a experimentar un declive neurológico entre sus ataques agudos sin período de remisión definido. Este declive puede incluir nuevos síntomas neurológicos, empeoramiento de la función cognitiva u otros déficits. La EM secundaria progresiva es el tipo más común de EM y provoca la mayor incapacidad.
- 35 La EM primaria progresiva describe aproximadamente al 10% de los individuos que nunca han experimentado una remisión tras sus síntomas de EM inicial. El declive se produce de forma continua sin ataques claros. El subtipo primario progresivo tiende a afectar a las personas de más edad en el momento de aparición de la enfermedad.
- La EM recurrente progresiva describe aquellos individuos que presentan, desde la aparición de la EM, un constante declive neurológico, pero que también sufren ataques superpuestos; es el menos común de todos los subtipos.
- 40 Aunque actualmente no se dispone de una cura definitiva para la EM, se han desarrollado diversas terapias destinadas a recuperar las funciones después de un ataque, a impedir nuevos ataques o a prevenir la incapacidad. Así, se utilizan diferentes terapias para aquellos pacientes que sufren ataques agudos; para aquellos del subtipo recurrente-remitente; para quienes padecen los subtipos progresivos; para aquellos no diagnosticados de EM pero que han tenido episodios de desmielinización; y para gestionar las diversas consecuencias de los ataques de EM.
- 45 Entre los agentes farmacológicos actualmente utilizados para la EM se encuentran los interferones, que se han aprobado para su utilización con tipos recurrentes de EM secundaria progresiva; acetato de glatiramer, un fármaco sintético compuesto por cuatro aminoácidos que se encuentran en la mielina y que estimula a las células T a segregar agentes antiinflamatorios que reducen la inflamación en los sitios de lesión; mitoxantrona, un agente utilizado para el tratamiento de la EM progresiva, progresiva-remitente y recurrente-remitente con empeoramiento; y
- 50 Natalizumab, un anticuerpo monoclonal que reconoce la integrina- $\alpha 4$.
- Con frecuencia se administran elevadas dosis de corticoesteroides vía intravenosa, como metilprednisolona, para el tratamiento de la EMRR, y se ha demostrado su eficacia a la hora de reducir la duración de los ataques sintomáticos recurrentes-remitentes. Como se describe en mayor detalle en este documento, también se utilizan inmunoglobulinas IgG vía intravenosa para el tratamiento de la EM.

Al igual que en el caso de la EM, otras enfermedades también se asocian a la inflamación cerebral, como la Enfermedad de Parkinson y la Enfermedad de Alzheimer, tal y como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, la quimioquina CCL13, aquí descrita, activa el receptor CCR2 de la quimioquina, que se expresa en la microglia y los astrositos. Ambos tipos de células se asocian a la Enfermedad de Parkinson y a la Enfermedad de Alzheimer. Por tanto, éste y otros de los marcadores aquí descritos resultan útiles para los ensayos de medicamentos, diagnósticos y pronósticos y para el tratamiento terapéutico de la Enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson con ARNsi y anticuerpos.

Se han utilizado satisfactoriamente inmunoglobulinas intravenosas (IVIG) para el tratamiento de diversas enfermedades autoinmunes del sistema nervioso central, incluyendo la esclerosis múltiple (EM). No obstante, los mecanismos subyacentes de acción de la IVIG no se han explicado satisfactoriamente. Por ello, se asume la identificación de los perfiles de expresión génica asociados a la actividad inmunomoduladora de la IVIG en pacientes con exacerbaciones agudas en EM recurrente-remitente (EMRR). Como se describe más adelante, se utilizan microarrays HU-133 de Affymetrix para estudiar los perfiles de expresión génica de las células T periféricas en 10 pacientes de EMRR antes y después de su tratamiento con IVIG. Los pacientes tratados con metilprednisolona intravenosa se incluyen como grupo control. La expresión diferencial de los genes representativos se confirmó mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Todos los pacientes se analizaron neurológicamente y mediante resonancia magnética de cerebro y columna antes y después de la terapia con IVIG.

Como se muestra seguidamente en los Ejemplos, se identificaron 360 genes que se expresaron de forma diferencial durante el tratamiento con IVIG. Algunos de ellos codifican quimioquinas, como CXCL3 y CXCL5, que se sabe se unen a la CXCR2, un receptor esencial para la regulación de la migración de oligodendrocitos en el cerebro. Otros codifican proteínas que participan en la transducción de la señal, la proliferación o la apoptosis.

Los estudios aquí descritos indican que, entre los genes que se expresan de forma diferencial, la regulación de la expresión de la quimioquina en células T periféricas es un importante y nuevo mecanismo de acción de la IVIG en pacientes con exacerbaciones agudas de EM. Así, los genes que aquí se describen pueden servir como marcadores diagnósticos para predecir el éxito del tratamiento de la terapia con IVIG y proporcionan nuevas dianas moleculares para el desarrollo de fármacos.

DEFINICIONES

En general, el término tratamiento con "IgG intravenosa" o "IVIG" se refiere a una composición de inmunoglobulinas IgG administradas vía intravenosa para el tratamiento de diversas enfermedades, como deficiencias del sistema inmune, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes. Las inmunoglobulinas IgG suelen agruparse y prepararse a partir de suero. Pueden utilizarse anticuerpos completos o fragmentos.

En general, el término "quimioquina" se refiere a una familia de pequeñas citoquinas que son segregadas por diversas células que promueven la quimiotaxia en las células que responden a ellas. Las quimioquinas también se conocen por la nomenclatura como familia de citoquinas SIS, SIG, SCY, superfamilia del factor plaquetario-4 o intercrinas. Las células que son atraídas por las quimioquinas siguen una señal de incremento de la concentración de quimioquina en dirección a la fuente de la quimioquina.

Algunos miembros de la familia de las quimioquinas controlan las células del sistema inmune durante el proceso de supervisión de la respuesta inmune, por ejemplo dirigiendo a los linfocitos hacia los ganglios linfáticos para permitir que éstos sobrevivan a la invasión de patógenos mediante la interacción con células de presentación del antígeno presentes en estos tejidos. Dichas quimioquinas se conocen como quimioquinas homeostáticas y son producidas y secretadas sin necesidad de estimulación de sus células fuente. Algunas quimioquinas desempeñan un papel en el desarrollo, por ejemplo promoviendo la angiogénesis o guiando las células hacia tejidos que proporcionan señales específicas críticas para la maduración celular. Otras quimioquinas son inflamatorias y son liberadas por muy diversas células en respuesta a infecciones bacterianas, virales y agentes que causan daños físicos. La liberación de las quimioquinas inflamatorias a menudo está estimulada por las citoquinas pro-inflamatorias, tales como interleucina 1. Las quimioquinas inflamatorias operan básicamente como quimioatrayentes para los leucocitos, reclutando monocitos, neutrófilos y otras células efectoras desde la sangre a los sitios de infección o a los tejidos dañados. Ciertas quimioquinas inflamatorias activan las células para iniciar una respuesta inmune o promover la cicatrización de heridas. Son liberadas por muchos tipos de células diferentes y sirven para guiar las células tanto del sistema inmune innato como del sistema inmune adaptativo.

Estructuralmente, las quimioquinas son proteínas pequeñas de masa molecular entre 8 y 10 kDa. Las quimioquinas también presentan aminoácidos conservados, que son muy importantes para crear estructuras tridimensionales o terciarias, así como (en la mayoría de los casos) cuatro cisteínas que interactúan entre sí dos a dos para crear una forma de greca, característica de esta clase de proteínas; los enlaces intramoleculares disulfuro típicamente unen el primero con el tercero y el segundo con el cuarto de los residuos cisteína, numerados según aparecen en la secuencia proteínica de la quimioquina.

Los miembros de la familia de las quimioquinas se categorizan en cuatro grupos según la separación de sus dos primeros residuos cisteína. Las quimioquinas CC (o β -quimioquinas) tienen dos cisteínas adyacentes cerca de su terminal amino. Se ha informado de la existencia de al menos 27 miembros diferentes de este subgrupo en los mamíferos, denominados ligandos de quimioquinas CC, (CCL)-1 a -28. Los dos primeros residuos cisteína en las quimioquinas CXC (o α -quimioquinas) se encuentran separados por un aminoácido, representado por "X". En los mamíferos se han descrito 17 quimioquinas CXC diferentes, que se subdividen en dos categorías, aquellas que cuentan con una secuencia de aminoácido específica (o motivo) de ácido glutámico-leucina-arginina (ELR) inmediatamente antes de la primera cisteína del motivo CXC (ELR-positivas) y aquellas que carecen de dicho motivo ELR (ELR-negativas). El tercer grupo de quimioquinas se conoce como quimioquinas C (o γ -quimioquinas) y se diferencia del resto de las quimioquinas en que tan sólo tiene dos cisteínas: una cisteína en el terminal N y otra aguas abajo. Un tercer grupo cuenta con tres aminoácidos entre las dos cisteínas y se denomina quimioquina CX₃C (o δ -quimioquinas).

Los receptores de la quimioquina son receptores acoplados a la proteína G que contienen 7 dominios transmembrana en la superficie de los leucocitos. Hasta la fecha se han caracterizado aproximadamente 19 receptores de la quimioquina diferentes, que se dividen en cuatro familias en función del tipo de qué enlazan; CXCR, que se enlazan a las quimioquinas CXC, CCR, que se enlazan a las quimioquinas CC, CX3CR1, que se enlaza a la quimioquina CX3C única (CX3CL1) y XCR1 que se enlazan a las dos quimioquinas XC (XCL1 y XCL2).

En general, la "señalización celular inducida por quimioquinas" se refiere a la capacidad que tienen los receptores de la quimioquina para asociarse a las proteínas G con el fin de transmitir las señales celulares tras el enlace del ligando. La activación de las proteínas G mediante los receptores de la quimioquina provoca la posterior activación de la fosfolipasa C (PLC). La PLC escinde un fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) en dos segundas moléculas mensajeras, trifosfato de inositol (IP3) y diacilglicerol (DAG), que desencadenan eventos de señalización intracelulares; el DAG activa otra enzima denominada proteína quinasa C (PKC) e IP3 desencadena la liberación de calcio desde los almacenes intracelulares. Estos eventos promueven la señalización en cascada, como la vía de las MAP quinasas, la cual genera respuestas que incluyen quimiotaxias, desgranulación, liberación de aniones superóxido y cambios en la avidéz de las moléculas de adhesión celular, como las integrinas, en el interior de la célula que alberga el receptor de la quimioquina.

El término "marcador" o "biomarcador" hace referencia a un ácido nucleico que se expresa en una célula y que resulta útil para proporcionar un pronóstico de esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR) en un paciente tratado con IVIG. Algunos de los biomarcadores que se describen aquí son moléculas que se encuentran sobreexpresadas en individuos con cuadro de esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR) tratados con IVIG, en comparación con individuos no tratados con IVIG o con pacientes de EMRR con anterioridad a su tratamiento con IVIG, por ejemplo, sobreexpresión de factor 1, sobreexpresión de factor 2, sobreexpresión de factor 3, o más. Alternativamente, otros biomarcadores son moléculas infraexpresadas en individuos con cuadros de esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR) tratados con IVIG, en comparación con los individuos no tratados con IVIG o con los pacientes de EMRR con anterioridad a su tratamiento con IVIG, por ejemplo, infraexpresión de factor 1, infraexpresión de factor 2, infraexpresión de factor 3, o más. Asimismo, un marcador puede ser una molécula sintetizada inadecuadamente en individuos que presentan esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR) tratados con IVIG, en comparación con los individuos no tratados con IVIG o con los pacientes de EMRR con anterioridad a su tratamiento con IVIG, por ejemplo, una molécula que contenga delecciones, adiciones o mutaciones, en comparación con la molécula expresada en una célula normal.

Cualquier experto en la materia comprenderá que los marcadores pueden utilizarse de forma aislada o en combinación con otros marcadores para cualquiera de los usos recomendados, por ejemplo, el pronóstico del tratamiento con IVIG de la esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR) que se describe en el presente documento.

"Muestra biológica" incluye muestras de fluidos biológicos, como sangre y líquido cerebroespinal, secciones de tejidos, como muestras procedentes de biopsias y autopsias, y secciones congeladas tomadas con fines histológicos. Dichas muestras incluyen sangre y fracciones o derivados sanguíneos (por ejemplo, suero, plasma, plaquetas, glóbulos rojos y similares), fluido cerebroespinal, esputos, fluido cervico-vaginal, linfa y tejidos procedentes de la lengua, células cultivadas, por ejemplo, cultivos primarios, explantes, y células transformadas, heces, orina, etc. Las muestras biológicas suelen obtenerse de organismos eucarióticos, preferiblemente de mamíferos como primates, por ejemplo, chimpancés o seres humanos, vacas, perros, gatos, roedores, por ejemplo, cobayas, ratas, ratones, conejos; o pájaros, reptiles o peces.

Los términos "sobreexpresar", "sobreexpresión" o "sobreexpresado" o "sobrerregulado" hacen referencia a un ácido nucleico (ARN) que se transcribe a un nivel detectablemente superior, en general en caso de aquellos pacientes que padecen esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR) y reciben tratamiento con IVIG, en comparación con un paciente no sometido a tratamiento con IVIG. El término incluye la sobreexpresión debida a la transcripción comparada con un control. La sobreexpresión puede detectarse utilizando técnicas convencionales para la detección de ARNm (es decir, RTPCR, PCR, hibridación). La sobreexpresión puede ser del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%,

70%, 80%, 90% o superior, en comparación con una célula normal. En determinados casos, la sobreexpresión es superior en 1, 2, 3, 4 o más niveles de transcripción o traducción en comparación con un control.

5 Los términos “infraexpresar”, “infraexpresión” o “infraexpresado” o “subregulado” se refieren indistintamente a un ácido nucleico que se transcribe a un nivel detectablemente inferior, en general en un paciente que padezca una esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR) tratada con IVIG, en comparación con un paciente que no esté sometido al tratamiento con IVIG. El término incluye la infraexpresión debida a la transcripción y la estabilidad del ARN en comparación con un control. La infraexpresión puede detectarse recurriendo a técnicas convencionales para la detección de ARNm (*es decir*, RT-PCR, PCR, hibridación). La infraexpresión puede ser del 10%, 20%, 30%, 40%, 10 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o inferior, en comparación con un control. En determinados casos, la infraexpresión es superior en 1, 2, 3, 4 o más niveles de transcripción o traducción en comparación con un control.

En el contexto de la presente invención, en general, el término “diferencialmente expresado” o “diferencialmente regulado” se refiere a un ácido nucleico que está sobreexpresado (aumentado) o infraexpresado (reducido) en una muestra comparada con al menos otra muestra, por lo general en el caso de un paciente de esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR) tratada con IVIG en comparación con un paciente no sometido a tratamiento con IVIG.

15 “Tratamiento terapéutico” se refiere a una terapia mediante fármacos, a una terapia hormonal, a una inmunoterapia y a una terapia biológica (dirigida).

En el presente documento, por “cantidad o dosis terapéuticamente efectiva” o “cantidad o dosis suficiente” se entiende una dosis que produce los efectos para los cuales se ha administrado. La dosis exacta dependerá de la finalidad del tratamiento y podrá ser calculada por cualquier experto en la materia recurriendo a técnicas conocidas 20 (*véase, por ejemplo*, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); y Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

Los términos “idéntico” o “identidad” porcentual en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipéptidos se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son la misma o que tienen un porcentaje especificado de residuos aminoácidos o nucleótidos que son iguales (*es decir*, en torno a una identidad del 60%, y preferiblemente del 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o superior con respecto a una región especificada, cuando se compara y alinea para una máxima correspondencia con respecto a una ventana de comparación o región designada) cuando se mide utilizando algoritmos de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con los parámetros predeterminados que se describen a continuación, o mediante alineación manual e inspección visual (*véase, por ejemplo*, la página web del NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> o similares). En ese caso, se dice que dichas secuencias son “sustancialmente idénticas”. Esta definición se refiere –o puede aplicarse– también al complemento de una secuencia de ensayo. La definición también incluye secuencias donde se han eliminado e insertado elementos, así como aquellas donde se han introducido sustituciones. Como se describe seguidamente, los algoritmos preferidos pueden tener en cuenta carencias y similares. Preferiblemente existe una identidad a lo largo de una región cuya longitud es de al menos 25 aminoácidos o nucleótidos, o más preferiblemente en una región cuya longitud oscila entre 50 y 100 aminoácidos o nucleótidos.

A la hora de comparar las secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias a comprobar. Cuando se utiliza un algoritmo de comprobación de secuencias, las 40 secuencias de comprobación y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si fuese necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. Preferiblemente, pueden utilizarse los parámetros predeterminados del programa, aunque pueden designarse parámetros alternativos. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencia calcula los porcentajes de identidad de secuencia correspondientes a las secuencias de prueba en comparación con la secuencia de referencia en función de los parámetros del programa.

Tal y como se utiliza en este documento, una “ventana de comparación” incluye la referencia a un segmento de cualquiera de las diversas posiciones contiguas seleccionadas de entre el grupo consistente entre 20 y 600, en general de entre 50 y 200, más habitualmente entre 100 y 150 aproximadamente, donde una secuencia se puede comparar con una secuencia de referencia con el mismo número de posiciones contiguas, después de que las dos 50 secuencias se hayan alineado de forma óptima. Los métodos de alineación de secuencias para su comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de secuencias para su comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo local de homología de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineamiento manual e inspección visual (*véase, por ejemplo*, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds. 1987-2005, Wiley Interscience)).

Un ejemplo de algoritmo preferido que resulta idóneo para determinar el porcentaje de identidad de la secuencia y similitud de la secuencia lo constituyen los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y col., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 (1977) y Altschul y col., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990), respectivamente. BLAST y BLAST 2.0 se utilizan, con los parámetros que aquí se describen, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia correspondiente a los ácidos nucleicos y proteínas de la invención. El software para realizar los análisis BLAST es público de National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica, primero, la identificación de pares de secuencias de alta puntuación (HSPs) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que se ajustan o satisfacen una puntuación T umbral valorada positivamente al alinearse con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. Se denomina "T" al umbral de puntuación de palabra adyacente (Altschul y col., véase *más arriba*). Estas coincidencias de palabras adyacentes iniciales actúan como semilla para iniciar búsquedas de HSPs mas largos que las contengan. Las coincidencias de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia, en la medida en que puede aumentarse la puntuación de alineamiento acumulada. Las puntuaciones acumuladas se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de las coincidencias de palabras en ambas direcciones se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulada desciende en una cantidad X con respecto a su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada pasa a ser cero o inferior, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o cuando se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T, y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como valores predeterminados una longitud de palabra (W) de 11, una esperanza (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una esperanza (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)) unas alineaciones (B) de 50, una esperanza (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas.

"Ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y sus polímeros, en forma de cadena sencilla o doble, así como a sus complementos. El término incluye ácidos nucleicos que contiene análogos conocidos de nucleótidos o residuos o enlaces modificados de la estructura que son sintéticos, de origen natural y de origen no natural, con unas propiedades de enlace similares a las del ácido nucleico de referencia, y que se metabolizan de forma similar a la de los nucleótidos de referencia. Entre los ejemplos de dichos análogos se encuentran, sin limitación, fosforotioatos, fosforoamidatos, metilfosfonatos, metilfosfonatos quirales, 2-O-metilribonucleótidos, ácidos péptidonucleicos (APNs).

"Molécula ARNi" o "ARNsi" se refiere a un ácido nucleico que forma un ARN de doble cadena, donde dicho ARN de doble cadena tiene la capacidad de reducir o inhibir la expresión de un gen o una diana cuando el ARNsi se expresa en la misma célula que el gen o gen diana. Así pues, "ARNsi" se refiere al ARN de doble cadena formado por las cadenas complementarias. Las partes complementarias del ARNsi que se hibridan para formar la molécula de doble cadena suelen gozar de una identidad sustancial o completa. En una realización, un ARNsi se refiere a un ácido nucleico que presenta una identidad sustancial o completa con un gen diana y que forma un ARNsi de doble cadena. La secuencia del ARNsi puede corresponder al gen diana de longitud total o a una subsecuencia del mismo. Normalmente, el ARNsi tiene una longitud de al menos 15 a 50 nucleótidos (por ejemplo, cada secuencia complementaria del ARNsi de doble cadena tiene una longitud de 15 a 50 nucleótidos y el ARNsi de doble cadena tiene una longitud de en torno a 15-50 pares de bases, preferiblemente en torno a 20-30 nucleótidos base, preferiblemente en torno a 20-25 nucleótidos de longitud, por ejemplo una longitud de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos).

Un polinucleótido "antisentido" es un polinucleótido sustancialmente complementario a un polinucleótido diana y que tiene la capacidad de hibridarse específicamente con el polinucleótido diana.

Las ribozimas son moléculas enzimáticas de ARN que pueden catalizar una escisión específica del ARN. La composición de las moléculas de ribozima incluye preferiblemente una o más secuencias complementarias de un ARNm, y la secuencia catalítica, perfectamente conocida, responsable de la escisión del ARNm, o una secuencia funcionalmente equivalente (véase, por ejemplo, la US Nº 5.093.246, incorporada en su totalidad a este documento por referencia). Las moléculas de ribozima diseñadas para escindir catalíticamente los transcritos de ARNm también pueden utilizarse para impedir la traducción de los ARNm diana.

A menos que se indique en otro sentido, una secuencia específica de ácido nucleico también incluye implícitamente variantes de la misma modificadas de forma conservativa (por ejemplo, sustitutos de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Concretamente, las sustituciones de codones degenerados pueden llevarse a cabo mediante la generación de secuencias donde la tercera posición de uno o más (o la totalidad) de los codones seleccionados se sustituye por residuos de base mixta y/o de desoxinosina (Batzler y col., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka y col., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossolini y

col., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)). El término ácido nucleico se utiliza indistintamente con los términos gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido y polinucleótido.

5 Una secuencia específica de ácido nucleico también incluye implícitamente “variantes empalmadas” y secuencias de ácido nucleico que codifican formas truncadas de una proteína. Igualmente, una proteína específica codificada por un ácido nucleico incluye de forma implícita cualquier proteína codificada mediante una variante empalmada o forma truncada de dicho ácido nucleico. “Variantes empalmadas”, como su propio nombre sugiere, son productos de empalme alternativo de un gen. Tras la transcripción, un transcripto inicial de ácido nucleico puede empalmarse de forma que los diferentes productos empalmados (alternativos) de ácido nucleico codifican distintos polipéptidos. Los mecanismos para la producción de variantes empalmadas varían, pero incluyen el empalme alternativo de los exones. Los polipéptidos alternativos obtenidos a partir del mismo ácido nucleico mediante transcripción de lectura completa también se incluyen en esta definición. Todos los productos pertenecientes a una reacción de empalme, incluyendo las formas recombinantes de los productos empalmados, quedan incluidos en esta definición. Los ácidos nucleicos pueden truncarse en el extremo 5' o en el extremo 3'. Los polipéptidos pueden truncarse en el Terminal N o en el Terminal C. Las versiones truncadas del ácido nucleico o de las secuencias de polipéptidos pueden darse en estado natural u obtenerse por recombinación.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos aminoácidos. Los términos son de aplicación a los polímeros de aminoácidos donde uno o más de los residuos aminoácidos es un producto químico artificial mimético del correspondiente aminoácido de origen natural, así como polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácido de origen no natural.

20 El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a aminoácidos análogos y aminoácidos miméticos que funcionan de forma similar a la de los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos modificados con posterioridad, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. El término análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que poseen la misma estructura química básica de un aminoácido de origen natural, es decir un carbono alfa unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina o metionina metil sulfonio. Dichos análogos presentan grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, aunque conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. El término mimético de aminoácidos se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura diferente a la estructura química general de un aminoácido pero que funcionan de forma similar a un aminoácido de origen natural.

Aquí puede hacerse referencia a los aminoácidos por sus símbolos de tres letras bien conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura de Bioquímica de la IUPAC-IUB. Igualmente, puede hacerse referencia a los nucleótidos mediante sus códigos de una sola letra habitualmente aceptados.

35 El término “Variantes modificadas de forma conservativa” se aplica tanto a las secuencias de aminoácidos como a las de ácidos nucleicos. En lo que respecta a las secuencias de ácido nucleico específicas, el término variantes modificadas de forma conservativa se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas o, cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a las secuencias esencialmente idénticas. Teniendo en cuenta la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos genera cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos ellos el aminoácido alanina. Así, en todas las posiciones en las cuales una alanina está especificada mediante un codón, el codón puede alterarse conforme a cualquiera de los correspondientes codones descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones del ácido nucleico son “variaciones silenciosas”, que constituyen una especie de variante modificada de forma conservativa. Cada una de las secuencias de ácido nucleico descritas en este documento que codifica un polipéptido también describe todas las posibles variaciones silenciosas del ácido nucleico. Cualquier experto en la materia reconocerá que todos los codones de un ácido nucleico (a excepción del AUG, que suele ser el único codón de la metionina, y del TGG, que suele ser el único codón del triptófano) pueden modificarse para obtener una molécula funcionalmente idéntica. De este modo, todas las variaciones silenciosas de un ácido nucleico que codifica un polipéptido se encuentran implícitas en cada una de las secuencias descritas con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a las secuencias cebadoras reales.

55 En lo que se refiere a la secuencia de aminoácidos, el experto en la materia observará que todas las sustituciones, elecciones o adiciones realizadas individualmente en un ácido nucleico, péptido, polipéptido o en una secuencia proteínica que alteren, añadan o eliminen un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos de la secuencia codificada se consideran una “variante modificada conservada” donde la alteración tiene como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. En la técnica son bien conocidas las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Dichas variantes modificadas conservadas complementan, pero no excluyen, las variantes polimórficas, homólogos interespecie y alelos de la invención.

Los ocho grupos siguientes contienen aminoácidos que pueden sustituirse entre sí de forma conservadora: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M). Véase, *por ejemplo*, Creighton, *Proteins* (1984).

5 Una “etiqueta” o “fracción detectable” es una composición detectable a través de medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunquímicos, químicos u otros medios físicos. Por ejemplo, las etiquetas útiles incluyen ³²P, tintes fluorescentes, reactivos densos de electrones, enzimas (por ejemplo las que suelen utilizarse habitualmente en los ensayos ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos y proteínas que pueden hacerse detectables, por ejemplo, por la incorporación de una radioetiqueta en el péptido, o que pueden utilizarse para la detección de anticuerpos específicamente reactivos con el péptido.

10 El término “recombinante”, cuando se utiliza haciendo referencia, por ejemplo, a una célula o a un ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, el ácido nucleico, la proteína o el vector han sido modificados mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogos o mediante la alteración de un ácido nucleico o proteína nativos, o que la célula se ha obtenido a partir de una célula así modificada. De este modo, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no-recombinante) de la célula, o expresan genes nativos que se expresan de forma anormal, o que están infraexpresados o no expresados en absoluto.

15 La frase “condiciones de hibridación estrictas” se refiere a las condiciones en las que una sonda se hibridará conforme a su subsecuencia objetivo, normalmente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero no conforme a otras secuencias. Las condiciones estrictas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias: las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más elevadas. Puede encontrarse una amplia guía sobre la hibridación de los ácidos nucleicos en Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes*, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993). En general, las condiciones estrictas seleccionadas son una temperatura entre 5 y 10°C inferior a la del punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica con una fuerza iónica y un pH definidos. T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH, y concentración de ácidos nucleicos definidos) a la cual el 50% de las sondas complementarias con la secuencia diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio (como las secuencias diana están en general presentes en exceso, en T_m, el 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio). Se pueden lograr también condiciones estrictas con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Para una hibridación selectiva o específica, una señal positiva es típicamente al menos dos veces la hibridación de fondo, preferentemente 10 veces la hibridación de fondo. Entre los ejemplos de condiciones estrictas de hibridación pueden citarse los siguientes: 50% formamida, 5x SSC y 1 % SDS, incubación a 42°C ó 5x SSC, 1% SDS, incubación a 65°C, con lavado en 0,2 x SSC y 0,1% SDS a 65°C.

20 Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí en condiciones estrictas siguen siendo sustancialmente idénticos en el caso de que los polipéptidos que codifican sean sustancialmente idénticos. Esto sucede, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico utilizando la máxima degeneración del codón permitida por el código genético. En estos casos, los ácidos nucleicos suelen hibridarse en condiciones de hibridación moderadamente estrictas. Entre los ejemplos de “condiciones de hibridación moderadamente estrictas” se encuentra una hibridación en solución tampón de formamida al 40%, NaCl 1M, SDS al 1% a 37°C y lavado en 1X SSC a 45°C. Una hibridación positiva es al menos dos veces la hibridación de fondo. Cualquier experto en la materia se dará cuenta rápidamente de que pueden utilizarse condiciones alternativas de hibridación y lavado para aportar condiciones similarmente estrictas. Pueden encontrarse directrices complementarias para la determinación de los parámetros de hibridación en numerosas referencias, así como en *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel u col., anteriormente citado.

25 Para la PCR, una temperatura de aproximadamente 36°C es típica para una amplificación en condiciones poco estrictas, aunque las temperaturas de apareamiento pueden variar entre aproximadamente 32 y 48°C, dependiendo de la longitud de los cebadores. Para una amplificación PCR de alto rigor, es típica una temperatura de aproximadamente 62°C, aunque las temperaturas de apareamiento de alto rigor pueden estar comprendidas entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 65°C, dependiendo de la longitud de los cebadores y la especificidad. Las condiciones típicas de los ciclos de amplificación tanto de alto como de bajo rigor incluyen una fase de desnaturalización de entre 90°C y 95°C durante un período variable de entre 30 segundos y 2 min., una fase de apareamiento de entre 30 segundos y 2 minutos y una fase de extensión de aproximadamente 72°C que dura entre 1 y 2 minutos. Los protocolos y las directrices para las reacciones de amplificación de bajo y alto rigor están disponibles, por ejemplo, en Innis y col. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Application* Academic Press, N.Y.

30 Los ácidos nucleicos de los genes diferencialmente expresados de la presente invención o de sus polipéptidos codificados se refieren a todos los tipos de ácidos nucleicos (por ejemplo genes, pre-ARNm, ARNm) o proteínas, sus variantes polimórficas, alelos, mutantes y homólogos interespecies que (en relación con el ácido nucleico o la proteína): (1) incluyen una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de aminoácidos superior al 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, y preferiblemente una identidad de secuencia del 91%, 92%, 93%, 94%,

95%, 96%, 97%, 98% o 99% o superior, preferiblemente en una región de al menos unos 25, 50, 100, 200, 500, 1.000 o más aminoácidos, a un polipéptido codificado por un ácido nucleico de referencia o una secuencia de aminoácidos descrita en este documento; (2) se unen específicamente a anticuerpos, por ejemplo anticuerpos policlonales levantados contra un inmunogen que comprende una secuencia de aminoácidos referenciada, fragmentos inmunogénicos de la misma y sus variantes modificadas conservadas; (3) se hibridan específicamente en condiciones estrictas de hibridación con un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos referenciada y sus variantes modificadas de forma conservada; (4) tienen una secuencia de ácido nucleicos cuya identidad de secuencia de nucleótidos es mayor a aproximadamente un 95%, preferiblemente superior a aproximadamente un 96%, 97%, 98%, 99%, o superior, preferiblemente en una región de al menos 25, 50, 100, 200, 500, 1.000 o más nucleótidos, a la correspondiente a una secuencia de ácido nucleico de referencia. Una secuencia de polinucleótido o polipéptido suele proceder de un mamífero, incluyendo, sin limitación, primates, por ejemplo seres humanos, roedores, como, ratas, ratones, hámsters; vacas, cerdos, caballos, ovejas o cualquier mamífero. Los ácidos nucleicos y proteínas de la invención incluyen tanto moléculas de origen natural como recombinantes. La definición también incluye las formas de estos antígenos truncadas y empalmadas de forma alternativa.

La frase “se une específicamente (o selectivamente)” en referencia a un ácido nucleico se refiere a una reacción de enlace que es determinante de la presencia del ácido nucleico, como los genes diferencialmente expresados de la presente invención, a menudo en presencia de una población heterogénea de ácidos nucleicos y otros productos biológicos.

“Determinación del efecto funcional” significa la realización de ensayos para determinar un compuesto que incrementa o disminuye un parámetro que se encuentra directa o indirectamente bajo la influencia de un biomarcador conforme a la invención, por ejemplo la medida de los efectos físicos, químicos o fenotípicos. Dichos efectos funcionales pueden medirse por cualquier método conocido por los expertos en la materia, por ejemplo cambios en las características espectroscópicas (como fluorescencia, absorbencia, índice de refracción); hidrodinámicas (por ejemplo, forma), cromatográficas; o propiedades de solubilidad de la proteína; ensayos de enlace de ligando, por ejemplo, unión con anticuerpos; medición de marcadores inducibles o activación transcripcional del marcador; medición de los cambios experimentados en la actividad enzimática; capacidad de aumentar o reducir la proliferación celular, apoptosis, detención del ciclo celular, medición de los cambios observados en los marcadores de la superficie celular. Los efectos funcionales pueden evaluarse de acuerdo con múltiples métodos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, microscopía, para la realización de medidas cuantitativas o cualitativas de las alteraciones de las características morfológicas, la medición de cambios en los niveles de ARN o de proteína para otros genes expresados en células sensibles a la quimioquina, la medición de la estabilidad del ARN, la identificación de la expresión del gen posterior o gen indicador (CAT, luciferasa, n-gal, GFP y similares), por ejemplo, por quimioluminiscencia, fluorescencia, reacciones colorimétricas, enlaces de anticuerpos, marcadores inducibles, etc.

Los términos “Inhibidores”, “activadores” y “moduladores” de los marcadores se utilizan para referirse a la activación, inhibición o modulación de las moléculas identificadas utilizando ensayos *in vitro* e *in vivo* de biomarcadores sensibles al tratamiento mediante IVIG de la esclerosis múltiple recurrente-remite (EMRR). Los inhibidores son compuestos que, por ejemplo, se unen a, bloquean total o parcialmente la actividad de, disminuyen, impiden, demoran la activación, desactivan, desensibilizan o reducen la actividad o expresión de biomarcadores sensibles al tratamiento mediante IVIG de la esclerosis múltiple recurrente-remite (EMRR). “Activadores” son aquellos compuestos que aumentan, abren, activan, facilitan, mejoran la activación, sensibilizan, agonizan, o regulan al alza la actividad de los biomarcadores sensibles al tratamiento mediante IVIG de la esclerosis múltiple recurrente-remite (EMRR), por ejemplo, agonistas. Los inhibidores, activadores o moduladores también incluyen versiones genéticamente modificadas de los biomarcadores sensibles al tratamiento mediante IVIG de la esclerosis múltiple recurrente-remite (EMRR), por ejemplo, versiones con actividad alterada, así como ligandos de origen natural y sintético, antagonistas, agonistas, anticuerpos, péptidos, péptidos cíclicos, ácidos nucleicos, moléculas antisentido, ribozimas, moléculas ARNi, pequeñas moléculas orgánicas y similares. Dichos ensayos de inhibidores y activadores incluyen, por ejemplo, la expresión de biomarcadores sensibles a la IVIG. El tratamiento de la esclerosis múltiple recurrente-remite (EMRR) *in vitro*, en células o extractos de células, la aplicación de compuestos moduladores putativos y la posterior determinación de los efectos funcionales sobre la actividad, como se ha descrito anteriormente.

Se compara una serie de muestras o ensayos que comprenden biomarcadores que responden al tratamiento mediante IVIG de la esclerosis múltiple recurrente-remite (EMRR), y que han sido tratadas con un activador, inhibidor o modulador potencial, con muestras de control sin el activador, inhibidor o modulador, para examinar el alcance de la inhibición. A las muestras de control (no tratadas con inhibidores) se les asigna un valor relativo de actividad de la proteína del 100%. La inhibición de los biomarcadores sensibles al tratamiento mediante IVIG de la esclerosis múltiple recurrente-remite (EMRR) se logra cuando el valor de la actividad, comparado con el producto de control, se sitúa en torno al 80%, preferiblemente en el 50%, más preferiblemente entre un 25% y un 0%. La activación de los biomarcadores sensibles al tratamiento mediante IVIG de la esclerosis múltiple recurrente-remite (EMRR) se logra cuando el valor de la actividad, comparado con el producto de control (sin tratar mediante activadores) es superior en un 110%, más preferiblemente en un 150%, más preferiblemente del 200-500% (es

decir, de dos a cinco veces más elevada en comparación con el producto de control), y más preferiblemente en un 1.000-3.000%.

5 El término “compuesto de ensayo” o “fármaco candidato” o “modulador” o sus equivalentes gramaticales, tal y como se utilizan en este documento, describe cualquier molécula de origen natural o sintético, por ejemplo, en el caso de una proteína, oligopéptido (por ejemplo, con una longitud de entre 5 y aproximadamente 25 aminoácidos, preferiblemente entre 10 y 20 o 12 y 18 aminoácidos de longitud y preferiblemente con una longitud de 12, 15, o 18 aminoácidos), pequeñas moléculas orgánicas, polisacáridos, péptidos, péptidos circulares, lípidos, ácidos grasos, ARNs, polinucleótidos, oligonucleótidos, etc; cuya capacidad para modular directa o indirectamente los biomarcadores que responden al tratamiento mediante IVIG de la esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR) va a comprobarse. El compuesto de ensayo puede presentarse en forma de librería de compuestos de ensayo, como una librería combinatoria o aleatorizada que facilite un grado de diversidad suficiente. Opcionalmente, los compuestos de ensayo se unen a un socio de fusión, por ejemplo, compuestos diana, compuestos de rescate, compuestos de dimerización, compuestos de estabilización, compuestos direccionables y otras fracciones funcionales. Convencionalmente, las nuevas entidades químicas con propiedades útiles se generan mediante la identificación de un compuesto de ensayo (denominado un “compuesto de partida”) con algunas propiedades o actividades deseables, por ejemplo, actividad inhibidora, creación de variantes del compuesto de partida, y evaluación de las propiedades y de la actividad de dichas variantes del compuesto. Frecuentemente se utilizan para dicho análisis métodos de screening (cribado) de alto rendimiento (HTS).

20 “Molécula orgánica pequeña” se refiere a una molécula orgánica de origen natural o sintético con un peso molecular superior a aproximadamente 50 dalton e inferior a aproximadamente 2.500 dalton, preferiblemente inferior a unos 2.000 dalton y más preferiblemente de entre 100 y unos 1.000 dalton, en especial de de entre 200 y 500 dalton.

MÉTODOS DE PRONÓSTICO

25 La presente invención facilita métodos para facilitar un pronóstico del tratamiento con IVIG de la esclerosis múltiple, incluyendo esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR), por detección de la expresión de un marcador infraexpresado en pacientes tratados con IVIG. La facilitación de un pronóstico implica la determinación del nivel de uno o más polinucleótidos biomarcadores sensibles a las IVIG en un paciente o muestra de un paciente, y su posterior comparación con una línea o rango de referencia. Normalmente, el valor de referencia es representativo de los niveles del ácido nucleico en un paciente que padezca esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR) con anterioridad al tratamiento con IVIG treatment, medidos utilizando una muestra biológica, como una muestra de fluido corporal (por ejemplo sangre o líquido cerebroespinal). La variación de los niveles de un polinucleótido conforme a la invención, con respecto a la línea de referencia (bien al alza o a la baja) indica que el paciente está sometándose ventajosamente al tratamiento mediante IVIG de la esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR).

35 Tal como se utiliza en este documento, el término “facilitar un pronóstico” se refiere a facilitar una predicción del probable curso y resultado del tratamiento de un paciente que padezca esclerosis múltiple, incluyendo esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR), con IVIG. Los métodos también pueden utilizarse para diseñar una terapia alternativa o adicional para el tratamiento de la esclerosis múltiple, incluyendo esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR). por ejemplo mediante la indicación del fallo del tratamiento con IVIG para aliviar la esclerosis múltiple, incluyendo esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR). El pronóstico puede también utilizarse para ajustar la dosis o la frecuencia de administración de la IVIG.

40 Pueden utilizarse moléculas que se unen al ácido nucleico como sondas, oligonucleótidos, matrices de oligonucleótidos y cebadores para detectar la expresión del ARN diferencial en las muestras de los pacientes, por ejemplo por RT-PCR. En una realización, se utiliza una RT-PCR de acuerdo con los métodos estándar conocidos en la técnica. En otra realización, pueden utilizarse ensayos PCR, como los ensayos Taqman® disponibles, por ejemplo, de Applied Biosystems, para detectar ácidos nucleicos y sus variantes. En otras realizaciones pueden utilizarse micromatrices qPCR y de ácido nucleico para detectar los ácidos nucleicos. Los reactivos que se unen a los biomarcadores seleccionados pueden obtenerse de acuerdo con métodos conocidos por el experto en la materia o adquirirse en el comercio.

50 El análisis de los ácidos nucleicos puede llevarse a cabo recurriendo a técnicas rutinarias, como análisis Southern, reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR) o cualquier otro método basado en la hibridación de una secuencia de ácido nucleico complementaria de una parte de la secuencia codificadora del marcador (por ejemplo, hibridación de transferencia por ranuras o slot blot) que también se encuentre dentro del ámbito de la presente invención. Las técnicas de amplificación PCR aplicables se describen, por ejemplo, en Ausubel y col. e Innis y col., mencionados más arriba. Se describen métodos generales de hibridación de ácidos nucleicos en Anderson, “Nucleic Acid Hybridization”, BIOS Scientific Publishers, 1999. También se puede llevar a cabo la amplificación o la hibridación de una pluralidad de secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, ADN genómico, ARNm o ADNc) a partir de secuencias de ARNm o ADNc dispuestas en una micromatriz. Los métodos de micromatriz se describen en general en Hardiman, “Microarrays Methods and Applications: Nuts & Bolts”, DNA

Press, 2003; y en Baldi y col., "DNA Microarrays and Gene Expression: From Experiments to Data Analysis and Modeling", Cambridge University Press, 2002.

5 El análisis de los marcadores de ácidos nucleicos y sus variantes puede llevarse a cabo por técnicas conocidas en el sector, incluyendo, sin limitación, micromatrices, análisis basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), análisis de secuencias y análisis electroforéticos. Un ejemplo no limitativo de análisis basado en la PCR incluye un ensayo de discriminación alélica Taqman® disponible de Applied Biosystems. Entre los ejemplos no limitativos de análisis de secuencias destacan la secuenciación de Maxam-Gilbert, la secuenciación de Sanger, la secuenciación de ADN en matrices capilares, la secuenciación de ciclo térmico (Sears y col., *Biotechniques*, 13:626-633 (1992)), la secuenciación en fase sólida (Zimmerman y col., *Methods Mol. Cell Biol.*, 3:39-42 (1992)), la secuenciación con espectrometría de masas, como ionización SELDI, ionización láser inducida en superficie, ionización por espectrometría de masas, ionización por desorción láser asistida por una matriz con un analizador de tiempo de vuelo; (MALDI-TOF/EM; Fu y col., *Nat Biotechnol.*, 16:381-384 (1998)), y la secuenciación por hibridación, Chee y col., *Science*, 274:610-614 (1996); Drmanac y col., *Science*, 260:1649-1652 (1993); Drmanac y col., *Nat. Biotechnol.*, 16:54-58 (1998). Entre los ejemplos no limitativos de análisis electroforético se incluye la electroforesis en gel en placa, como electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, electroforesis capilar y electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización. Otros métodos de detección de variantes de ácido nucleico incluyen, por ejemplo, la prueba INVADER® de Third Wave Technologies, Inc., el análisis de Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), hibridación del nucleótido específica del alelo, ensayos de movilidad heterodúplex, análisis del polimorfismo conformacional de cadena única (SSCP), extensión de cebador con un único nucleótido (SNUPE) y pirosecuenciación.

10 Puede utilizarse una fracción detectable para los ensayos que se describen en este documento. Puede utilizarse una amplia gama de fracciones detectables donde la selección de la etiqueta depende de la sensibilidad requerida, de la facilidad de conjugación con el anticuerpo, de requisitos de estabilidad y de la instrumentación disponible y las disposiciones en materia de eliminación de residuos. Fracciones detectables adecuadas incluyen, sin limitación, radio-nucleidos, tintes fluorescentes (por ejemplo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregon Green™, rodamina, rojo de Texas, isotiocianato de tetraerodimina (TRITC), Cy3, Cy5, etc.), marcadores fluorescentes (por ejemplo proteína verde fluorescente (GFP), ficoeritrina, etc.), compuestos fluorescentes automáticamente desactivados/activados por proteasas asociadas a tumores, enzimas (por ejemplo luciferasa, peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina, etc.), nanopartículas, biotina, digoxigenina y similares.

25 Los formatos físicos útiles comprenden superficies que cuentan con una pluralidad de emplazamientos discretos y direccionables para la detección de una pluralidad de diferentes marcadores. Dichos formatos incluyen micromatrices y determinados dispositivos capilares (véase, por ejemplo, Ng y col., *J. Cell Mol. Med.*, 6:329-340 (2002); Patente US Nº 6.019.944). En estas realizaciones, cada emplazamiento discreto superficial puede comprender anticuerpos para la inmovilización de uno o más marcadores para su detección en cada uno de los emplazamientos. Alternativamente, las superficies pueden comprender una o más partículas discretas (por ejemplo micropartículas o nanopartículas) inmovilizadas en puntos discretos de una superficie, incluyendo dichas micropartículas anticuerpos para la inmovilización de uno o más marcadores para su detección.

30 El análisis puede llevarse a cabo en diversos formatos físicos. Por ejemplo, podría recurrirse a la utilización de placas de microtitulación o automatización para facilitar el procesamiento de grandes cantidades de muestras de prueba. Alternativamente, podrían desarrollarse formatos de muestra única para facilitar un pronóstico puntual.

35 Alternativamente, las sondas de ácido nucleico de la invención pueden aplicarse a secciones de biopsias de pacientes inmovilizadas en placas de microscopio. El patrón de hibridación *in situ* resultante puede visualizarse utilizando cualquiera de los diferentes métodos microscópicos luminosos o fluorescentes conocidos en la técnica.

40 En otro formato, los diversos marcadores de la invención también facilitan reactivos para técnicas de diagnóstico por imagen *in vivo*, por ejemplo, imágenes de reactivos etiquetados que detectan los ácidos nucleicos de los biomarcadores de la invención.

PREPARACIONES Y ADMINISTRACIÓN DE LA IVIG

45 Se han descrito composiciones de IVIG que comprenden anticuerpos completos para el tratamiento de ciertas condiciones autoinmunes (véase, por ejemplo, las Publicaciones de Patente US 2002/0114802, 2003/0099635 y 2002/0098182). Las composiciones de IVIG descritas en dichas referencias incluyen anticuerpos policlonales.

50 Las preparaciones de inmunoglobulina según la presente invención se pueden preparar a partir de cualquier material de partida adecuado. Por ejemplo, pueden obtenerse preparaciones de inmunoglobulina a partir de suero de un donante o de inmunoglobulinas monoclonales o recombinantes. En un ejemplo típico, se recoge sangre procedente de donantes sanos. En general, la sangre se extrae de la misma especie animal que el sujeto al que va a administrarse la preparación de inmunoglobulina (normalmente denominadas inmunoglobulinas "homólogas"). Las inmunoglobulinas se aíslan de la sangre mediante una serie de procedimientos adecuados, por ejemplo

fraccionamiento de Cohn, ultracentrifugación, preparación electroforética, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de inmunoafinidad, fraccionamiento con polietilenglicol o similares (véase, por ejemplo, Cohn y col., J. Am. Chem. Soc. 68:459-75 (1946); Oncley y col., J. Am. Chem. Soc. 71:541-50 (1949); Barundern y col., Vox Sang. 7:157-74 (1962); Koblet y col., Vox Sang. 13:93-102 (1967); Patentes US N° 5.122.373 y 5.177.194).

En ciertas realizaciones, la inmunoglobulina se prepara a partir de productos que contienen gamma-globulina obtenidos a partir de procesos de fraccionamiento alcohólico y/o de métodos cromatográficos de intercambio iónico o afinidad bien conocidos por el experto en la materia. Habitualmente se emplea Fracción II de Cohn purificada. La pasta de partida de la Fracción II de Cohn típicamente contiene un 95% de IgG e incluye los cuatro subtipos de IgG. Los diferentes subtipos están presentes en la Fracción II en aproximadamente la misma proporción en que se encuentran en los pools de plasma humano a partir de los que se obtienen. La Fracción II se purifica además antes de ser formulada en forma de producto a administrar. Por ejemplo, la pasta de Fracción II se puede disolver en una solución acuosa alcohólica purificada fría y las impurezas se eliminan mediante precipitación y filtración. Tras una filtración final, la suspensión de inmunoglobulina puede ser dializada o diafiltrada (por ejemplo empleando membranas de ultrafiltración con un límite nominal de peso molecular inferior o igual a 100.000 dalton) para eliminar el alcohol. La solución se puede concentrar o diluir para obtener la concentración proteica deseada y puede adicionalmente purificarse mediante técnicas bien conocidas por el experto en la materia.

Se pueden aplicar pasos preparativos para enriquecer un isotipo o subtipo de inmunoglobulina. Por ejemplo, se puede emplear una cromatografía de proteína A, proteína G o proteína H seferosa para enriquecer una mezcla de inmunoglobulinas en relación a la IgG o a subtipos específicos de IgG (véase Harlow y Lane, Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999); Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Patente US N° 5.180.810).

También pueden emplearse fuentes comerciales de inmunoglobulinas. Tales fuentes incluyen, sin limitarse a, Gammagard S/D® (Baxter Healthcare); BayRho-D® products (Bayer Biological); Gamimune N®, 5% (Bayer Biological); Gamimune N®, 5% Solvent/Detergent Treated (Bayer Biological); Gamimune N®, 10% (Bayer Biological); Sandoglobulin I.V.® (Novartis); Polygam S/D® (American Red Cross); Venoglobulin-S® 5% Solution Solvent Detergent Treated (Alpha Therapeutic); Venoglobulin-S® 10% Solution Solvent Detergent/Treated (Alpha Therapeutic); and VZIG® (American Red Cross). La fuente comercial empleada en la preparación de inmunoglobulina para su uso en los métodos de la presente invención no es crítica.

Una alternativa es emplear fragmentos de anticuerpos, como fragmentos Fc de inmunoglobulinas. Una preparación de Fc incluye fragmentos Fc de inmunoglobulinas. El término "fragmento de Fc" se refiere a una parte de una región constante de cadena pesada de una inmunoglobulina que contiene al menos un dominio pesado de región constante (por ejemplo C_{H2}, C_{H3} y/o C_{H4}) o una parte antigénica del mismo, excluyendo las regiones variables de la inmunoglobulina (tal como se emplea aquí, una región variable se refiere a una región de la inmunoglobulina que se une a un antígeno, pero excluye los dominios C_{H1} y C_L). La preparación de Fc puede contener fragmentos completos de Fc y/o partes de los mismos (por ejemplo uno o más dominios pesados de región constante o partes de los mismos que incluyen epítopes enlazados por factores reumatoideos). Opcionalmente, un fragmento de Fc puede incluir una región bisagra de inmunoglobulina, un dominio de cadena pesada C_{H1} y/o un dominio de cadena pesada unido a un dominio C_L de cadena ligera.

Una preparación de Fc incluye fragmentos Fc de al menos un isotipo de Fc y puede incluir una mezcla de fragmentos Fc de inmunoglobulina de diferentes isotipos (por ejemplo IgA, IgD, IgE, IgG y/o IgM). La preparación de Fc también puede contener predominantemente (al menos un 60%, 75%, 90%, 95% o un 99%) de fragmentos Fc de un isotipo de inmunoglobulina así como cantidades menores de los otros subtipos. Por ejemplo, una preparación de Fc puede incluir al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 90%, un 95% o un 99% de fragmentos Fc de IgG. Además, la preparación de Fc puede comprender un único subtipo de IgG o una mezcla de dos o más subtipos de IgG. Subtipos de IgG adecuados incluyen IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En una realización específica, la preparación de Fc comprende fragmentos de Fc de IgG1.

La preparación de Fc está esencialmente libre de fragmentos F(ab')₂ (esto es de regiones de cadena variable ligeras y pesadas primera constante y una parte de la región bisagra, que pueden obtenerse por digestión con pepsina de la molécula anticuerpo); fragmentos Fab' (esto es fragmentos Fab' que pueden obtenerse por reducción de los puentes disulfuro del fragmento F(ab')₂) o fragmentos Fab (esto es que pueden obtenerse por tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor). En este contexto, "esencialmente libre" significa que la preparación de Fc contiene menos de aproximadamente un 30%, menos de aproximadamente un 20%, menos de aproximadamente un 10%, menos de aproximadamente un 5% o menos de aproximadamente un 1% de fragmentos F(ab')₂, Fab' o Fab. En otra realización, la preparación de Fc contiene fragmentos de Fc que están esencialmente libres de fragmentos F(ab')₂, Fab' o Fab. Típicamente, las preparaciones de Fc están esencialmente libres de inmunoglobulinas completos (es decir de longitud total). En este contexto, "sustancialmente libre" significa que menos de aproximadamente un 25% o menos de aproximadamente un 10% o menos de aproximadamente un 5% o

menos de aproximadamente un 2%, menos de aproximadamente un 1% están libres de inmunoglobulinas de longitud completa.

5 Las inmunoglobulinas pueden segmentarse en cualquier momento adecuado durante la preparación para separar los fragmentos de Fc de los de Fab, F(ab') y/o F(ab')₂. Una enzima adecuada para ello es, por ejemplo, papaína, pepsina o plasmina (véase por ejemplo Harlow y Lane, *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999); Plan y Makula, *Vox Sanguinis* 28:157-75 (1975)). Después de la segmentación, las partes de Fc se pueden separar de los fragmentos de Fab, F(ab') y/o F(ab')₂ por ejemplo mediante cromatografía de afinidad de intercambio iónico, filtración en gel y similares. En un ejemplo específico, las inmunoglobulinas son digeridas con papaína para separar el fragmento de Fc de los fragmentos Fab. La mezcla de digestión se somete entonces a una cromatografía de intercambio catiónico para separar los fragmentos de Fc de los de Fab.

10 La Inmunoglobulina o los fragmentos Fc también pueden prepararse a partir de hibridomas u otros sistemas de cultivo que expresen anticuerpos monoclonales (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature* 256:495-97 (1975); Hagiwara y Yuasa, *Hum. Antibodies Hibridomas* 4:15-19 (1993); Kozbor y col., *Immunology Today* 4:72 (1983); Cole y col., en *Anticuerpos monoclonales and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)). Los anticuerpos monoclonales humanos pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de hibridomas humanos (véase, por ejemplo, Cote y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-30 (1983)) o mediante la transformación de células humanas B con el virus EBV *in vitro* (véase, por ejemplo, Cole y col., *supra*). Los anticuerpos monoclonales elaborados a partir de hibridomas se pueden purificar y los fragmentos Fc pueden separarse de los fragmentos Fab, F(ab') y/o F(ab')₂ tal como se describe aquí o como es conocido por el experto en la materia.

20 La inmunoglobulina o los fragmentos Fc también pueden producirse a través de métodos recombinantes, por ejemplo, a partir de sistemas de cultivo de células eucarióticas. Por ejemplo, se puede producir de forma recombinante un fragmento Fc de una inmunoglobulina con células ováricas de hámster chino (CHO) transfectadas con un vector que contiene una secuencia de ADN que codifica el fragmento Fc. Los métodos de creación de dichas células recombinantes de mamífero se describen, por ejemplo, en Sambrook y Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York) 2001) y en Ausubel y col., *Short Protocols in Molecular Biology*, 4ª ed. (John Wiley & Sons, Inc. (New York) 1999), y son bien conocidos por el experto en la materia. El Fc recombinante también puede obtenerse a partir de otras líneas celulares de mamíferos, como células renales de crías de hámster (BHK). También se conocen en la técnica métodos de cultivo de células recombinantes para la obtención de proteínas recombinantes.

25 Pueden utilizarse otros muchos sistemas de expresión para expresar las inmunoglobulinas o los fragmentos Fc recombinantes. Entre ellos se encuentran, con carácter no limitativo, sistemas celulares de insectos y microorganismos, como levaduras o bacterias, que han sido transfectados o transformados mediante un casete de expresión que codifica el fragmento Fc deseado. En ciertas realizaciones, el microorganismo puede opcionalmente diseñarse de forma que reproduzca los patrones de glicosilación de los fragmentos Fc humanos o mamíferos.

30 En determinadas realizaciones puede recurrirse a fases adicionales de preparación para obtener una preparación de inmunoglobulina o Fc que resulte segura para su utilización con los métodos de la presente invención. Dichas fases pueden incluir, por ejemplo, tratamiento con disolventes/detergentes, pasteurización y esterilización. Pueden utilizarse otras fases adicionales de preparación para garantizar la seguridad de la preparación Fc. Dichas fases de preparación pueden incluir, por ejemplo, hidrólisis enzimática, modificación química por reducción y alquilación, sulfonación, tratamiento con β-propiolactona, tratamiento a pH bajo o similares. También pueden encontrarse descripciones de los métodos adecuados, por ejemplo, en las patentes US nº 4.608.254; 4.687.664; 4.640.834; 4.814.277; 5.864.016; 5.639.730 y 5.770.199; Romer y col., *Vox Sang.* 42:62-73 (1982); Romer y col., *Vox Sang.* 42:74-80 (1990); y Rutter, *J. Neurosurg. Psychiat.* 57 (Suppl.): 2-5 (1994) (las descripciones se incorporan aquí por referencia).

45 Se administra al sujeto una cantidad efectiva de una inmunoglobulina o de una preparación de Fc generalmente vía intravenosa. El término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad de una preparación de inmunoglobulina o Fc que tiene como resultado una mejoría o alivio de la EMRR en el sujeto. La cantidad efectiva a administrar al sujeto puede ser determinada por un médico teniendo en cuenta las diferencias individuales de edad, peso, gravedad de la enfermedad y respuesta a la terapia. En determinadas realizaciones, puede administrarse una preparación de inmunoglobulina o Fc a un sujeto a razón de aproximadamente entre 5 mg/kilogramo y aproximadamente 500 mg/kilogramo diarios. En realizaciones adicionales, puede administrarse una preparación de inmunoglobulina o Fc en cantidades de al menos unos 10 mg/kilogramo, al menos 15 mg/kilogramo, al menos 20 mg/kilogramo, al menos 25 mg/kilogramo, al menos 30 mg/kilogramo al menos 50 mg/kilogramo. En realizaciones adicionales, puede administrarse a un sujeto una preparación de inmunoglobulina o Fc a unas dosis diarias de hasta unos 100 mg/kilogramo, unos 150 mg/kilogramo, unos 200 mg/kilogramo, unos 250 mg/kilogramo, unos 300 mg/kilogramo, unos 400 mg/kilogramo. En otras realizaciones, las dosis de la preparación de inmunoglobulina o Fc pueden ser mayores o menores. La preparación de inmunoglobulina o Fc puede administrarse en una o más dosis diarias.

De acuerdo con la presente invención, el tiempo requerido para completar un ciclo de tratamiento puede ser determinado por un médico y puede variar entre un día y más de un mes. En ciertas realizaciones, un ciclo de tratamiento puede variar entre 1 y 6 meses.

COMPOSICIONES, KITS Y SISTEMAS INTEGRADOS

- 5 La invención proporciona composiciones, kits y sistemas integrados para la realización de los ensayos descritos en este documento utilizando ácidos nucleicos específicos de los polinucleótidos de la invención.

Normalmente, los kits para la realización de las pruebas diagnósticas de la invención suelen incluir una sonda que comprende una secuencia de ácido nucleico que se une específicamente a los polinucleótidos de la invención y una etiqueta para detectar la presencia de la sonda. Los kits pueden incluir diversas secuencias de polinucleótidos.

10 MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS

- Pueden utilizarse diversos métodos para la identificación de compuestos que prevengan o sirvan para el tratamiento de la esclerosis múltiple, incluyendo la esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR). Normalmente, se adapta un ensayo que facilita un parámetro fácilmente medible para su realización en los pocillos de placas de múltiples pocillos, a fin de facilitar la detección de los elementos de una librería de compuestos de prueba conforme a lo aquí descrito. Así, en una realización, puede disponerse un número adecuado de células, por ejemplo de células T, en los pocillos de una placa de múltiples pocillos, pudiendo determinarse el efecto de un compuesto de prueba sobre la expresión de un biomarcador de la esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR) sensible a las IVIG.

- Los compuestos a ensayar pueden ser cualquier compuesto químico de pequeñas dimensiones o una macromolécula, como una proteína, azúcar, ácido nucleico o lípido. Normalmente, los compuestos de prueba consistirán en moléculas químicas y péptidos de reducidas dimensiones. Esencialmente puede utilizarse cualquier compuesto químico en este aspecto de la invención, aunque con frecuencia se utilicen compuestos que pueden disolverse en soluciones acuosas u orgánicas (especialmente, los basados en DMSO). Los ensayos están diseñados para detectar librerías químicas de gran tamaño mediante la automatización de las fases del ensayo y la facilitación de compuestos obtenidos a partir de cualquier fuente adecuada para los ensayos, que normalmente se realizan en paralelo (por ejemplo, en formatos de microtitulación o en placas de microtitulación en ensayos robóticos). Se observará que existen multitud de proveedores de compuestos químicos, incluyendo Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (St. Louis, MO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs Switzerland) y similares.

- En una realización preferente, se utilizan métodos de detección de alto rendimiento, que implican la utilización de una librería combinatoria química o de péptidos que contenga un gran número de posibles compuestos terapéuticos. Dichas "librerías químicas combinatorias" o "librerías de ligandos" se detectan posteriormente en uno o más ensayos según lo aquí descrito para identificar aquellos integrantes de la librería (especies o subclases químicas específicas) que tienen la actividad característica deseada. En esta fase se detecta en dichos compuestos su capacidad para reducir o incrementar la expresión de los biomarcadores de la esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR) de la invención.

- Una librería química combinatoria es una recopilación de diversos compuestos químicos generados por síntesis química o biológica combinando diversos "bloques funcionales" químicos como reactivos. Por ejemplo, se forma una librería química combinatoria lineal, como una librería de polipéptidos, mediante la combinación de un conjunto de bloques químicos funcionales (aminoácidos) en cualquier forma posible para una longitud de compuesto determinada (es decir, el número de aminoácidos que se encuentran en un compuesto polipéptido). Pueden sintetizarse millones de compuestos químicos mediante dicha mezcla combinatoria de bloques funcionales químicos.

- La preparación y detección de las librerías químicas combinatorias son bien conocidas para el experto en la materia. Dichas librerías químicas combinatorias incluyen, de forma no limitativa, librerías de péptidos (véase, por ejemplo, la patente US 5.010.175, Furka, Int. J. Pept. Prot. Res., 37:487-493 (1991) y Houghton y col., Nature, 354:84-88 (1991)). Pueden utilizarse otras sustancias para obtener librerías de diversidad química. Dichas sustancias incluyen, sin limitación, peptoides (por ejemplo, Publicación PCT N° WO 91/19735), péptidos codificados (por ejemplo, Publicación PCT N° WO 93/20242), bio-oligómeros aleatorios (por ejemplo, Publicación PCT N° WO 92/00091), benzodiazepinas (por ejemplo, Patente US N° 5.288.514), diversómeros, como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs y col., PNAS USA, 90:6909-6913 (1993)), polipéptidos vinillogos (Hagihara y col., J. Amer. Chem. Soc., 114:6568 (1992)), miméticos de péptidos no peptídicos con estructura de glucosa (Hirschmann y col., J. Amer. Chem. Soc., 114:9217-9218 (1992)), síntesis orgánicas análogas de librerías de pequeños compuestos (Chen y col., J. Amer. Chem. Soc., 116:2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho y col., Science, 261:1303 (1993)) y/o peptidilfosfonatos (Campbell y col., J. Org. Chem., 59:658 (1994)), librerías de ácidos nucleicos (véase Ausubel, Berger y Sambrook, todos ellos citados anteriormente), librerías de ácidos nucleicos péptidos (véase, por ejemplo, la patente US N° 5.539.083), librerías de anticuerpos (véase, por ejemplo, Vaughn y col., Nature Biotechnology, 14(3):309-314 (1996) y PCT/US96/10287), librerías de hidratos de carbono (véase, por ejemplo, Liang y col.,

Science, 274:1520-1522 (1996) y la patente US N° 5.593.853), librerías de pequeñas moléculas orgánicas (véanse, por ejemplo, benzodiazepinas, Baum C&EN, Jan 18, página 33 (1993); isoprenoides, patente US N° 5.569.588; tiazolidinonas y metatiazanonas, patente US N° 5.549.974; pirrolidinas, patentes US N° 5.525.735 y 5.519.134; compuestos morfolino, patente US N° 5.506.337; benzodiazepinas, 5.288.514, y similares).

5 Los dispositivos para la preparación de librerías combinatorias se encuentran disponibles en el comercio (véase, por ejemplo, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA). Por otra parte, también se encuentran disponibles comercialmente numerosas librerías combinatorias (véase, por ejemplo, ComGenex, Princeton, N.J., Asinex, Moscú, Rusia, Tripos, Inc., St. Louis, MO, ChemStar, Ltd, Moscú, Rusia, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MD, etc.)

10 En los ensayos de alto rendimiento de la invención, es posible detectar hasta varios miles de diferentes moduladores o ligandos en un solo día. Concretamente, cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación puede utilizarse para llevar a cabo un ensayo independiente relativo a un posible modulador seleccionado o, en el caso de que lo que van a observarse son los efectos de la concentración o del tiempo de incubado, se puede comprobar un solo
15 modulador cada 5-10 pocillos. De este modo, con una sola placa de microtitulación estándar se pueden ensayar alrededor de 96 moduladores. Si se utilizan placas de 1.536 pocillos, con una sola placa se podrán ensayar entre unos 100 y unos 1.500 compuestos diferentes. Es posible someter a ensayo muchas placas por día; es posible realizar ensayos de detección de unos 6.000, 20.000, 50.000 o 100.000 o más compuestos diferentes utilizando los sistemas integrados de la invención.

20 **Métodos de inhibición de la expresión de la proteína del marcador utilizando ácidos nucleicos**

Pueden utilizarse diversos ácidos nucleicos, como ácidos nucleicos antisentido, ARNsi o ribozimas, para inhibir la función de los marcadores de la presente invención. Las ribozimas que escinden el ARNm en secuencias de reconocimiento específicas de emplazamiento se pueden utilizar para destruir ARNm diana, especialmente
25 utilizando ribozimas en cabeza de martillo. Las ribozimas en cabeza de martillo escinden los ARNm en una serie de emplazamientos dictados por las regiones de flanqueo que forman pares de bases complementarios con el ARNm diana. Preferiblemente, el ARNm diana tiene la siguiente secuencia de dos bases: 5'-UG-3'. La construcción y producción de las ribozimas en cabeza de martillo es bien conocida en la técnica.

Las ribozimas diana genéticas contienen necesariamente una región de hibridación complementaria de dos regiones, cada una de las cuales tiene una longitud de al menos 5 y preferiblemente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15,
30 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de un ARNm diana. Asimismo, las ribozimas poseen una actividad endoribonucleasa altamente específica, que escinde de forma autocatalítica el ARNm sentido diana.

En lo que respecta al antisentido, pueden utilizarse oligonucleótidos de ARNsi o ribozimas u oligonucleótidos fosforotioato. Las modificaciones del enlace fosfodiéster, así como las del heterociclo o del azúcar pueden facilitar una mayor eficacia. Se utiliza el fosforotioato para modificar el enlace fosfodiéster. Se ha descrito que un enlace
35 fosforamidato N3'-P5' estabiliza los oligonucleótidos en las nucleasas y aumenta los enlaces con el ARN. La unión del ácido péptido-nucleico (APN) sustituye por completo la estructura formada por ribosa y el fosfodiéster y es estable ante las nucleasas, aumenta la afinidad del enlace con el ARN y no permite la escisión por la RNAsa-H. Su estructura básica también puede tratarse mediante modificaciones que pueden permitir su optimización como componente antisentido. En lo que respecta a las modificaciones del heterociclo, se ha demostrado que algunas
40 modificaciones del heterociclo aumentan los efectos antisentido sin interferir en la actividad de la RNAsa-H. Un ejemplo de dicha modificación lo constituye la modificación C-5 tiazol. Por último, también puede tenerse en cuenta la modificación del azúcar. Las modificaciones de 2'-O-propil y de 2'-metoxietoxi-ribosa estabilizan los oligonucleótidos en las nucleasas, tanto en cultivos celulares como *in vivo*.

Los oligonucleótidos inhibidores pueden administrarse a una célula mediante transfección directa o mediante
45 transfección y expresión a través de un vector de expresión. Entre los vectores de expresión adecuados se incluyen los vectores de expresión mamíferos y vectores virales, donde se ha clonado un oligonucleótido inhibidor con las secuencias reguladoras adecuadas, incluyendo un promotor, para obtener como resultado la expresión del ARN antisentido en una célula huésped. Los promotores adecuados pueden ser promotores constitutivos o específicos de desarrollo. La transfección puede llevarse a cabo a través de reactivos de transfección liposomales, bien conocidos
50 en la técnica (por ejemplo, el reactivo de transfección Xtreme, Roche, Alameda, CA; las formulaciones de Lipofectamine, Invitrogen, Carlsbad, CA). La administración mediada por liposomas catiónicos, vectores retrovirales y la administración directa también ha demostrado ser eficaz. Otra posible forma de administración es la selección mediante la utilización de anticuerpos de los marcadores de la superficie celular para las células diana.

Para la transfección, una composición que comprenda una o más moléculas de ácido nucleico (con o sin vectores)
55 puede comprender un vehículo de administración, incluyendo liposomas, para su administración a un sujeto, vehículos y disolventes y sus sales, y/o puede encontrarse presente en formulaciones farmacéuticamente aceptables. Los métodos de administración de las moléculas de ácido nucleico se describen, por ejemplo, en

- Gilmore y col., *Curr Drug Delivery* (2006) 3:147-5 y Patil y col., *AAPS Journal* (2005) 7:E61-E77. La administración de las moléculas de ARNsi también se describe en diversas publicaciones de patentes estadounidenses, incluyendo por ejemplo 2006/0019912; 2006/0014289; 2005/0239687; 2005/0222064 y 2004/0204377. Las moléculas de ácido nucleico pueden administrarse a las células mediante diversos métodos conocidos por el experto en la materia, incluyendo, sin limitación, encapsulación en liposomas, iontoforesis, electroporación o su incorporación a otros vehículos, incluyendo polímeros biodegradables, hidrogeles, ciclodextrinas (véase, por ejemplo, Gonzalez y col., 1999, *Bioconjugate Chem.*, 10, 1068-1074; Wang y col., las publicaciones Internacionales PCT N° WO 03/47518 y WO 03/46185), microesferas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y PLCA (véase, por ejemplo, la patente US N° 6.447.796. y la publicación de la solicitud de patente US N° 2002/130430), nanocápsulas biodegradables, y microesferas bioadhesivas, o mediante vectores proteínico-acuosos (O'Hare y Normand, publicación internacional PCT N° WO 00/53722). En otra realización, las moléculas de ácido nucleico de la invención también pueden formularse o constituirse en complejos con polietileneimina y sus derivados, como polietileneimina-polietilenglicol-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-GAL) o derivados de polietileneimina-polietilenglicol-tri-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-triGAL).
- 5 Ejemplos de reactivos de transfección liposomal a utilizar en esta invención son, por ejemplo, CellFectin, la formulación del liposoma 1:1.5 (M/M) del lípido catiónico N,N,N,N-tetrametil-N,N,N,N-tetrapalmit- γ -espermina y dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE) (GIBCO BRL); Cltofectina GSV, la formulación del liposoma 2:1 (M/M) de un lípido catiónico y DOPE (Glen Research); DOTAP (N41-(2,3-dioleoiloxi)-N,N,N-tri-metil-amoniometilsulfato) (Boehringer Mannheim); Lipofectamina, la formulación del liposoma 3:1 (M/M) del lípido policationico DOSPA y el lípido neutro DOPE (GIBCO BRL); y (5) siPORT (Ambion); HiPerfect (Qiagen); X-treme GENE (Roche); RNAicARRIER (Epoch Biolabs) y TransPass (New England Biolabs).

En algunas realizaciones, las secuencias antisentido, ARNsi o ribozimas se administran a la célula a través de un vector de expresión mamífero. Por ejemplo, vectores de expresión mamíferos adecuados para la expresión del ARNsi se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo Ambion (por ejemplo, vectores pSilencer), Austin, TX; Promega (por ejemplo, GeneClip, siSTRIKE, SiLentGene), Madison, WI; Invitrogen, Carlsbad, CA; InvivoGen, San Diego, CA; e Imgenex, San Diego, CA. Normalmente, los vectores de expresión para la transcripción de las moléculas ARNsi tendrán un promotor U6.

En algunas realizaciones, las secuencias antisentido, ARNsi o de ribozimas se administran a las células a través de un vector de expresión viral. Los vectores virales adecuados para la administración de dichas moléculas a las células incluyen vectores adenovirales, vectores adenoasociados y vectores retrovirales (incluyendo vectores lentivirales). Por ejemplo, los vectores virales desarrollados para la administración y expresión de oligonucleótidos siRNA se encuentran comercialmente disponibles de, por ejemplo, GeneDetect, Bradenton, FL; Ambion, Austin, TX; Invitrogen, Carlsbad, CA; Open BioSystems, Huntsville, AL; e Imgenex, San Diego, CA.

Ejemplos

35 Los ejemplos siguientes tienen carácter ilustrativo y no limitativo de la invención reivindicada.

Ejemplo 1: Métodos y Materiales

Pacientes participantes en el estudio

Se incluyeron 10 pacientes consecutivos con EM aguda recurrente clasificados de acuerdo con los criterios de McDonald (McDonald W.I. y col., *Ann Neurol*, 50:121-27 (2001)). El diagnóstico de la EM definida se basa en los criterios de McDonald (Kurtzke J.F., *Neurology*, 33:1444-1452 (1983)).

45 La EDSS (Dastidar P. y col., *Med Biol Eng Comput*, 37:104-7 (1999)) y la MRI cerebral volumétrica se evaluaron con respecto al valor de referencia (en el momento de la recurrencia, inmediatamente antes del tratamiento) y 3 semanas después de la finalización de la terapia con IVIG (Elovaara I. y col., *Intravenous Immunoglobuline is effective and well tolerated in the treatment of EM Relapse*, Manuscrito remitido). El primer resultado del estudio representó un cambio de la puntuación EDSS con respecto al valor de referencia hasta la semana 3 tras el inicio de la terapia con IVIG el día 21. Las medidas secundarias obtenidas supusieron cambios en los volúmenes de T1, T2, Flair y lesiones realizadas por gadolinio (Gd), en el número de lesiones realizadas por Gd y volúmenes cerebrales (Elovaara I. y col., *Intravenous Immunoglobuline is effective and well tolerated in the treatment of EM Relapse*, Manuscrito remitido; Dastidar P. y col., *Med Biol Eng Comput*, 37:104-7 (1999)).

50 Las características de los pacientes se incluyen en la Tabla 1. Antes de incorporarse al estudio, todos los pacientes firmaron un impreso de autorización. El estudio recibió la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de Tampere, Finlandia.

Se excluyó a aquellos pacientes que habían recibido tratamiento con inmunosupresores en los nueve meses anteriores y a los que se les habían administrado corticoesteroides en las 8 semanas anteriores. Todos los

pacientes recibieron 0,4 g/kg/día de Endobulina (Baxter AG, Viena, Austria) durante 5 días. La evaluación clínica de los pacientes se llevó a cabo con anterioridad al tratamiento con IVIG, 1 día después de la finalización de la terapia al cabo de 21 días. La evaluación clínica incluyó un examen neurológico, la determinación de la puntuación EDSS, el índice-brazo o el índice ambulatorio. Un grupo de control formado por cinco pacientes recibió un tratamiento estándar de 100 mg/día de IVMP durante 3 días.

Tabla 1 Características de los pacientes incluidos en el estudio

Características	Pacientes tratados con IVIC	Pacientes tratados con IVMP (control)
Número de pacientes	10	5
Edad (años, promedio \pm Desv. Est.)	40 \pm 10,6	35,3 \pm 8,8
Sexo (varón/mujer)	3 vs 7	0 vs 5
Duración de la enfermedad (años, promedio \pm Desv. Est.)	5,6 \pm 3,5	5,2 \pm 3,6
Tiempo actual / Recaída anterior (meses, promedio \pm Desv. Est.)	17,6 \pm 21,0	5 \pm 3,2
Puntuación EDSS durante la remisión (promedio \pm Desv. Est.)	2,3 \pm 0,95	3,2 \pm 2,4
Puntuación EDSS en el momento de la recaída aguda (promedio \pm Desv. Est.)	3,7 \pm 1,1	4,2 \pm 2,0

Análisis MRI

Los exámenes mediante MRI cerebral se llevaron a cabo utilizando una unidad de MRI de 1,5 Teslas (Philips Gyroscan ACS NT Intera, Best, Holanda) de acuerdo con lo descrito (Kurtzke J.F., *Neurology*, 33:1444-1452 (1983)). El protocolo MRI incluyó un localizador sagital T1 (recuperación de inversión atenuada por líquido) (FLAIR), contraste por transferencia de magnetización (MTC) T1, eco de spin T1 (SE), eco de spin turbo T2 (TSE) (3mm de espesor y separación de 0mm) y secuencias MTC T1 realizadas por gadolinio. Se utilizaron las secuencias T1 axial SE (3mm de espesor y separación de 0mm) y FLAIR axial (5mm de espesor y 1mm de separación) para el análisis volumétrico de las placas. Los análisis computerizados volumétrico y de segmentación semiautomática se llevaron a cabo utilizando el software Anatomatic, operando en un entorno Windows. Se informa de la variabilidad inter- e intra-observador de los resultados volumétricos (Dastidar P. y col., *Med Biol Eng Comput*, 37:104-7 (1999); Heinonen T. y col., *J Med Eng Technol*, 22:173-8 (1998)). La exactitud volumétrica del programa anatómico se analizó de acuerdo con lo descrito (Dastidar P. y col., *Med Biol Eng Comput*, 37:104-7 (1999)). Se controló el adecuado reposicionamiento de las cabezas utilizando la misma bobina cefálica, las mismas ubicaciones anatómicas y el mismo paquete de imágenes en diferentes secuencias de MRI. Las médulas espinales completas se escanearon separándolas en su parte superior e inferior. Se utilizó el mismo scanner para todos los exámenes por resonancia magnética.

Preparación de las muestras de ARN

Las muestras de sangre se obtuvieron utilizando tubos de preparación celular Vacutainer CPTTM (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Las células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC) se separaron de la sangre periférica en los 60 min siguientes al muestreo de la sangre por centrifugado en gradiente de densidad (Lymphoprep, Nycomed, Roskilde, DK) conforme al protocolo del fabricante. Las células se separaron en células T y células no T utilizando una mezcla de perlas Dynabeads magnéticas no estimulantes anti-CD4+ y anti-CD8+ (DynaL Biotech, Oslo, N) a 4°C. Las pellas celulares obtenidas de $5 \cdot 10^6$ células se mezclaron minuciosamente con 1 ml de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las muestras de ensayo alícuotas se congelaron y almacenaron a -80°C hasta su posterior procesamiento. El ARN total se aisló conforme al protocolo del fabricante. Las pellas de ARN se disolvieron en agua libre de nucleasa (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se almacenaron a -80°C.

Análisis de micromatrices

Se utilizó el biochip HU-133A Genechip (Affymetrix, Santa Clara, CA), que contenía aproximadamente 33.000 genes humanos. Se transcribieron, etiquetaron e hibridaron 5 μ g de ARN total *in vitro* en la matriz de acuerdo con el protocolo del fabricante (véase Affymetrix.com). La calidad del ARN se verificó antes de su tratamiento *in vitro* utilizando un bioanalizador (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

Análisis estadístico de los Datos de Expresión del Gen

El análisis estadístico de los datos de expresión del gen se llevó a cabo en las instalaciones de Tübingen, Eberhard-KarlsUniversity Tübingen, Alemania. Los archivos Affymetrix CHP se importaron en Genespring 7.1 para el análisis estadístico de los datos. Las señales de cada matriz se dividieron por la mediana de todas las señales de las

matrices, partiendo del punto temporal cero. Posteriormente, se llevó a cabo una normalización “por gen” dividiendo todas las señales de un gen por la mediana de la señal de dicho gen. De este modo, las señales de cada gen se inician en el punto temporal cero alrededor de 1 y muestran los valores superiores a 1 cuando se produce el incremento, y viceversa. Las señales se sometieron a una transformación logarítmica y se calcularon los valores de factor de cambio y p (test t de Welch) (Han T. y col., BMC bioinformatics, 7:9 (2006)) para cada gen, realizando comparaciones dos a dos. Se identificaron los conjuntos de sondas con un valor de fold change superior a 2 y un valor p inferior a 0,05 en gráficos volcán y se denominaron estadísticamente significativos.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Los datos de expresión génica obtenidos mediante análisis de micromatrices para cuatro genes representativos se confirmaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real cuantitativa. Con este fin, se utilizaron 11 µg de ARN del total de las células T para realizar la transcripción inversa en ADNc conforme al protocolo del fabricante (MB1 Fermentas, Burlington, Canadá). Para cada muestra a analizar, se disolvieron 100 mg ADNc en 5µl de agua libre de nucleasa (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se analizaron cualitativamente utilizando diferentes ensayos personalizados TaqMan y ABPrism 7000 (ambos de Applied Biosystems, Foster City, CA). Los datos se analizaron utilizando el método $\Delta\Delta CT$, que suele utilizarse para realizar la cuantificación relativa (Livak K.J. y Schmittgen T.D., Methods, 25:402-40 (2001)). Para la normalización de los datos de expresión se incluyó gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa humana como gen de mantenimiento. Para verificar la normalización se utilizó como control un segundo gen de mantenimiento, β-microglobulina (no se muestran los datos).

Ejemplo 2: Resultado clínico del tratamiento con IVIG de los pacientes

El análisis de los resultados clínicos del estudio demostró que un ciclo de cinco días con terapia IVIG tuvo como resultado una reducción significativa de la puntuación EDSS en la totalidad de los 10 pacientes (Fig. 1). La eficacia de la terapia con IVIG se vio respaldada por la mejora de la mayoría de las variables de MRI (Tabla 2). Aunque se observaron efectos similares en el grupo de control sometido a tratamiento estándar con IVMP (Tabla 2), los cambios observados en las variables de la MRI del grupo de control no resultaron estadísticamente significativos. El tratamiento con IVIG resultó seguro y fue bien tolerado.

Tabla 2 Análisis por MRI de las anomalías cerebrales antes y después del tratamiento con IVIG e IVMP

	Antes trat. con IVIG	Tras trat. con IVIG		Antes trat. con IVMP	Tras trat. con IVMP
Parámetro	Vol lesión cm ³	Vol lesión cm ³	Parámetro	Vol lesión cm ³	Vol lesión cm ³
	Media ± SE	Media ± SE		Media ± SE	Media ± SE
T1	1,76 ± 0,55	1,73 ± 0,59	T1	1,41 ± 0,60	1,64 ± 0,84
T2	5,49 ± 1,09	5,08 ± 1,03*	T2	11,15 ± 4,59	9,83 ± 4,17
Flair	15,76 ± 2,23	14,09 ± 1,94**	Flair	24,37 ± 8,19	23,18 ± 8,05
Realzada por Gd	0,32 ± 0,27	0,21 ± 0,24**	Realzada por Gd	0,70 ± 0,39	0,63 ± 0,37
Volumen cerebral	1124,94 ± 40,61	1120,31 ± 40,72	Volumen cerebral	1056,32 ± 47,78	1045,07 ± 52,53
Gd+lesión N	2,83 ± 0,71	2,00 ± 0,60**	Gd+lesión N	3,0 ± 1,5	2,7 ± 1,4
Puntuación EDSS	3,8 ± 0,3	2,6 ± 0,2**	Puntuación EDSS	4,2 ± 2,0	3,3 ± 2,4

* p<0,05; **p<0,01; EDSS = escala ampliada del estado de discapacidad (EDSS) de Kurtzke; Gd = Volúmenes de la lesión realzada por Gadolinio

Ejemplo 3: El tratamiento con IVIG no altera significativamente la composición celular de las células obtenidas para el aislamiento del ARN

Las PBMCs obtenidas a partir de la sangre periférica se separaron en células T y células no T utilizando una mezcla de perlas Dynabeads magnéticas no estimulantes anti-CD4+ y antiCD8+ a 4°C. Este procedimiento se seleccionó para impedir la estimulación de las células T durante la separación celular. Para asegurarse de que las posibles diferencias en los perfiles de expresión génica no se debieran a diferencias en la composición celular de las diversas muestras, se compara la expresión de los genes que codifican CD3, CD4, CD8 y CD14 entre las muestras obtenidas en diferentes puntos temporales para cada paciente. Los resultados indican que la composición celular de las muestras obtenidas de cada paciente durante diversos días es similar (Figuras 2A, 2B). No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Ejemplo 4: Análisis de los datos de expresión génica obtenidos de pacientes sometidos a tratamiento con IVIG

El análisis estadístico de los datos de expresión génica incluyeron todos los resultados obtenidos en los análisis de micromatrices en tres puntos temporales diferentes (antes del tratamiento, 1 día y 21 días después del comienzo del tratamiento) e incluyó la totalidad de los 10 pacientes tratados con IVIG. Los análisis revelaron que 360 genes de células T periféricas habían experimentado significativos cambios de expresión durante el transcurso del tratamiento

con IVIG. La expresión de 91 de estos genes cambió entre el día 0 y el día 6, la expresión de 147 genes cambió entre el día 0 y el día 21, y la expresión de 122 genes cambió entre el día 6 y el día 21.

El análisis estadístico del grupo de pacientes de control sometidos a tratamiento con IVMP mostró una expresión diferencial de 583 genes, experimentando los cambios la mayoría (218 genes) entre el día 0 y el día 6.

- 5 Las Tablas 3a-3d presentan los 20 cambios más significativos en la expresión génica observados en pacientes sometidos a tratamiento con IVIG e IVMP.

Tabla 3a Los 10 genes que mostraron la mayor regulación al alza en células T periféricas de los pacientes en la terapia con IVIG

Factor cambio	de Punto temporal	Título del gen	Símbolo del Gen	ID Sec Ref
4,37	21 vs 6	Factor regulador transcripcional 1	TRERFI	NM_018415
4,26	21 vs 0	Marco abierto de lectura 28 del cromosoma 19	C19orf28	NM_174983
4	6 vs 0	Inhibidor IC de la quinasa dependiente de la ciclina (p57, Kip2)	CDKNIC	NM_000076
3,86	21 vs 6.	Cáncer de mama 1, aparición temprana	BRCA1	NM_007294
3,83	6 vs 0	Secuencia del clon 23555 del ARNm	-	-
3,54	21 vs 6	-	-	-
3,52	21 vs 6	Proteína 4 de enlace del dominio SH3	SH3BP4	NM_014521
3,5	6 vs 0	Colágeno, tipo III, alfa 1 (Síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV, dominante atosomal)	COL3A1	NM_000090
3,41	21 vs 0	UDP-Gal;beuGlcNAc polipéptido 2 de la beta 1,3-galactosiltransferasa,	B3GALT2	NM_003783
3,36	21 vs 6	Fosfolipasa DI (glicosil)fosfatidilinositol específica,	GPLDI	NM_001503

10 **Tabla 3b Los 10 genes que mostraron la mayor regulación a la baja en las células T periféricas de los pacientes en la terapia con IVIG**

Factor cambio	Punto temporal	Título del gen	Símbolo del Gen	ID Sec Ref
-4,82	6 vs 0	Proteína 7 relacionada con la miombularina	MTMR7	NM_004686
-3,96	6 vs 0	Proteína transmembrana con dominio similar al EGF y dos dominios similares a la follistatina	TMEFF1	NM_003692
-3,9	21 vs 0	Subcomplejo 5 de NADH deshidroxigenasa (ubiquinona) 1 alfa, 13kDa	NDUFA5	NM_005000
-3,89	21 vs 6	Colágeno, tipo III, alfa 1 (Síndrome Ehlers-Danlos tipo IV, dominante autosomal)	COL3A1	NM_000090
-3,59	21 Vs 6	Homólogo 2 del gen supresor tumoral (Drosophila)	FAT FAT2	NM_001447
-3,57	21 vs 6	Pseudogen RAD52 de la proteína reparadora de los daños del ADN y de recombinación	-	-
-3,34	21 vs 0	Ligando 5 de la quimioquina (C-X-C motif)	CXCL5	NM_002994
-3,34	21 vs 0	Proteína Receptor DSC43 de las células madre	LOC51333	NM_016643
-3,26	21 vs 6	Receptor del péptido natriurético C/Guanilato ciclasa C (receptor C del péptido atrionatriurético)	NPR3	NM_000908
-3,22	21 vs 6	Respuesta de crecimiento temprano 2 (Homólogo Krox-20, Drosophila)	EGR2	NM_000399

Tabla 3a/b: Puntos temporales: 6 vs) representa genes con una expresión diferente entre el día 0 y el día 6: 21 vs 0 representa genes con una expresión diferencial entre el día 21 y el día 0; y 21 vs 6 se refiere a los genes con un cambio de expresión entre el día 6 y el día 21.

Tabla 3c Los 10 genes que mostraron la mayor regulación al alza en las células T periféricas de los pacientes en la terapia con IVMP

Factor cambio	Punto temporal	Título del gen	Símbolo del Gen	ID Sec Ref
15,94	21 vs 6	Receptor de leucocitos similar al de la inmunoglobulina, subfamilia A (sin dominio TM), elemento 4	ILT7	NM_012276
9,26	21 vs 6	prostaglandina D2 sintasa 21 kDa (cerebro)	PTGDS	NM_000954
8,91	21 vs 6	Periostina, factor específico del osteoblasto	POSTN	NM_006475

8,64	21 vs 6	miembro 5A de la familia del punto de integracion MMTV wingless	WNT5A	NM_003392
8,31	21 vs 6	prostaglandina D2 sintasa 21 kDa (cerebro) ///	PTGDS	NM_000954
7,94	21 vs 6	prostaglandina D2 sintasa 211 kDa (cerebro)		
7,41	21 vs 6	inhibidor IC de la quinasa dependiente de la ciclina (p57. Kip2)	CDKN1C	NM_000076
7,41	21 vs 6	inhibidor IC de la quinasa dependiente de la ciclina (p57. Kip2)	CDKN1C	NM_000076
7,33	6 vs 0	defensina, alfa 1, secuencia mioelide relacionada ///	DEFA1 ///	NM_005217
6,48	6 vs 0	defensina, alfa 3, neutrófilo.especifica		
6,48	6 vs 0	Dominio POU, clase 1, factor de transcripción 1 (Pit1, factor 1 de la hormona del crecimiento)	POU1F1	NM_000306
6	6 vs 0	cadherina 13, H-cadherina (corazón)	CDH13	NM_001257

Tabla 3d Los 10 genes que mostraron la mayor regulación a la baja en las células T periféricas de los pacientes en la terapia con IVMP

Factor cambio	Punto temporal	Título del gen	Símbolo del Gen	ID Sec Ref
-11,52	6 vs 0	Receptor de leucocitos similar al de inmunoglobulina, subfamilia A (sin dominio TM), elemento 4	ILT7	NM_012276
-9,73	6 vs 0	motivo tripartito conteniendo 58	TRIM58	NM_015431
-9,11	21 vs 6	Anticuerpo de Zwilch	FLJ10036	NM_017975
-8,24	21 vs 0	integrina, alfa 1	PELO	NM_015946
-7,86	21 vs 0	Proteína de dedos de zinc 6(CMPX1)	ZNF6	NM_021998
-7,36	21 vs 6	Intersectina 1 (proteína del dominio SH3)	ITSN1	NM_003024
-7,3	21 vs 6	Proteína 1 inducida por forbol-12-miristato-13-acetato	PMAIPI	NM_021127
-7,28	21 vs 0	Proteína transmembrana 47	TMEM47	NM_031442
-6,84	6 vs 0	----	---	---
-6,82	6 vs 0	prostaglandina D2 sintasa 21 kDa (cerebro)	PTGDS	NM_000954

Tabla 3c/d: Puntos temporales: 6 vs 0 representa genes con una expresión diferente entre el día 0 y el día 6; 21 vs 0 representa genes con una expresión diferencial entre el día 21 y el día 0; y 21 vs 6 se refiere a los genes con un cambio de expresión entre el día 6 y el día 21.

5 Los genes más afectados en su expresión por el tratamiento con IVIG incluyen aquellos que codifican proteínas que regulan el ciclo celular (factor regulador transcriptional 1, TRERF1; inhibidor de la quinasa dependiente de la ciclina 1C, CDKN1C; cáncer de mama 1, BRCA1; proteína 4 de enlace del dominio, SH3BP4), pero también proteínas reguladoras de la inflamación [quimioquina (C-X-C motif) ligando 5, CXCL5], la adhesión celular (homólogo 2 supresor de tumores FAT, FAT2) o la diferenciación celular (respuesta de crecimiento temprano, EGR2). Otros genes incluidos en la lista codifican proteínas que participan en el transporte de electrones, la fosforilación, la glicosilación, el desarrollo estructural o proteínas cuya función no se ha definido aún.

15 Otros genes de interés que fueron regulados diferencialmente con el tratamiento con IVIG codificaron proteínas implicadas en la regulación inmune, como la interleucina 11 (IL11), quimioquina (motivo C) ligando 2 (XCL2), receptor 4 de la prostaglandina E (PTGER4), caspasa 2 (CASP2), receptor similar al de la inmunoglobulina de células asesinas de cola citoplásmica corta 1 de dos dominios (KIR2DS1), proteína quinasa 2 activada por mitógeno (MAP4K2), ligando 5 (CXCL5) de la quimioquina (motivo C-X-C), ligando 3 (CXCL3) de la quimioquina (motivo C-X-C), elemento E de la familia 4 del dominio de la lectina de tipo C, (CLEC4E), ligando 13 de la quimioquina (motivo C-C) (CCL13) y alfa-fetoproteína (AFP) (véase la Tabla 4).

Tabla 4 Genes diferencialmente expresados bajo tratamiento con IVIG que codifican proteínas que participan en la regulación inmune

(obsérvese que el número de acceso de CLEC4E debería ser NM_014358, y no NM_013458 en la Tabla 4).

Factor cambio	Punto temporal	Título del gen	Símbolo del Gen	ID Sec Ref
2	6 vs 0	Interleucina 11	IL11	NM_000641
2,38	21 vs 0	ligando 2 de la quimioquina (C motif)	XCL2	NM_003175
2,28	21 vs 0	receptor 4 de la prostaglandina E (subtipo EP4)	PTGER4	NM_000958
2,02	21 vs 0	caspasa 2, cisteína proteasa mediada por apoptosis	CASP2	NM_032982

2,37	21 vs 6	(con expresión de la célula precursora neural) receptor similar al de la inmunoglobina de células asesinas de cola citoplásmica corta 1 de dos dominios	K1 R2DS1	NM_014512
2,35	21 vs 0	proteína quinasa quinasa quinasa quinasa 2 activada por mitógeno	MAP4K2	NM_004579
-3,34	21 vs 0	ligando 5 de la quimioquina (motivo C-X-C)	CXCL5	NM_002994
-2,46	21 vs 0	ligando 3 de la quimioquina (motivo C-X-C)	CXCL3	NM_002090
-2,26	21 vs 0	familia 4 del dominio de la lectina tipo C,	CLEC4E	NM_013458
-3,06	21 vs 6	ligando 13 de la quimioquina (motivo ligando C-C)	CCL13	NM_005408
-2,53	21 vs 6	alfa-fetoproteína	AFP	NM_001134

Tabla 4: Puntos temporales: 6 vs 0 representa genes con una expresión diferente entre el día 0 y el día 6: 21 vs 0 representa genes con una expresión diferencial entre el día 21 y el día 0; y 21 vs 6 se refiere a los genes con un cambio de expresión entre el día 6 y el día 21.

Ejemplo 5: Comparación de los Datos de Expresión Génica obtenidos de Pacientes tratados con IVIG y pacientes tratados con IVMP

5 Cuando se compararon los datos de expresión génica obtenidos de pacientes tratados con IVIC comparados con los datos de expresión génica obtenidos de pacientes tratados con IVMP, se identificaron 17 genes cuya expresión se alteraba significativamente en ambos grupos de pacientes (Tabla 5). La mayor parte de las proteínas codificadas por estos 17 genes regulan el ciclo celular (HABP4, STAT1, CDKN1, SH3BP4 y ORC1L). Estos resultados indican que la regulación del ciclo celular podría ser un mecanismo de eficacia terapéutica que tienen en común ambos fármacos. Los otros genes que resultaron estar regulados diferencialmente tan sólo se encontraron en uno de los dos grupos de tratamiento y, por tanto, reflejan mecanismos de acción que son específicos tan sólo de uno de los dos fármacos.

Tabla 5 Intersección de genes con expresión diferencial bajo tratamiento con IVIG y tratamiento con IVMP

Título del Gen	Símbolo del gen	Descripción del proceso biológico GO	ID de la Sec. de Ref.
cadherin 5, tipo 2. VE-cadherin (epitelio vasc.)	CDH5	Adherencia celular /// célula	NM_001795
proteína 4 de enlace de hialuronano	HABP4	--	NM_014282
Transductor de señal y activador de la transcripción 1, 91kDa	STAT1	Regulación de ciclo celular /// regulación de transcripción, ADN-dependiente /// transcripción a partir del promotor de ARN de la polimerasa 11 /// activación de la caspasa /// cascada señalización intracelular /// 1-kappaB quinasa/NF-kappaB cascada /// fosf. tirosina	NM_007315
Inhibidor IC de la quinasa dependiente de la ciclina (p57, K1p2)	CDKN1C	Regulación de la actividad quinasa de la proteína dependiente de la ciclina ///fase G1 del ciclo mitótico celular /// ciclo celular/// detención del ciclo celular/// regulación negativa de la proliferación celular /// regulación negativa del ciclo celular	NM_000078
actinina, alfa 2	ACTN2		NM_001103
histona 1, H2bh	HIST1 H2BH	Conjunto del nucleosoma /// Conjunto nucleosoma /// cromosoma y biogénesis (sensu Eucariota)	NM_003524
proteína 4 de enlace del dominio SH3	SH3BP4	/// ciclo celular	NM 014521
Complejo reconoc. origen, tipo subunidad 1 (levadura)	ORC11	Replicación ADN /// Inicio de la replicación del ADN	NM_004153
Producto génico KIAA0644	KIAA0644	-	NM_014817
Sulfato de heparano(glucosamina) 3-O-sulfotransferasa 1	HS3ST1	-	NM_005114
ropporin, rhopilin, proteína 1B asociada	ROPNIB	citoquinas///transducción de la seña l/// transducción de la señal de la	NM_00101233 7

			proteína Rho ///espermatogénesis /// reacción acrosomal /// fusión esperma / membrana de plasma de huevo /// adherencia célula-célula/// movilidad del esperma	
Fibra densa exterior de colas de esperma 2	OOF2	-		NM_002540
proteína desconocida	-	-		
1-acigliocerosol-3-fosfato O-- acetiltransferasa 7	AGPAT7	Metabolismo		NM_153813
Proteína de dedos de zinc 804A	ZNF804A	-		NM 194250
Dominio de dedos de zinc tipo TRAF que contiene 1	TRAFDI	-		NM_008700

Ejemplo 6: Confirmación mediante PCR en tiempo real de los Datos de Expresión Génica obtenidos por análisis de micromatrices

5 Los datos obtenidos por análisis de micromatrices fueron confirmados mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Para ello se seleccionaron 4 genes que codificaban proteínas de las que se sabía que regulaban la regulación inmune (véase Tabla 4): PTGER4, CXCL5, 111 y CASP2. Los resultados de la PCR en tiempo real se muestran en la Figura 3A-D. Los resultados obtenidos por PCR en tiempo real confirman los datos obtenidos mediante el análisis de micromatrices (Figura 3A-D, y Tablas 3 y 4).

DISCUSIÓN

10 Este estudio se diseñó para identificar genes que tuviesen una expresión diferencial en células periféricas T de pacientes con EMRR en fase de exacerbación aguda con posterioridad al tratamiento con IVIG. Se ha demostrado que las células periféricas T (células T CD4+ y CD8+) participan en la patogénesis de la enfermedad y especialmente en el proceso de desmielinización y degeneración axonal (Stinissen P. y col., *Mult Scler.*, 4:203-11 (1998)). Esto se ve respaldado por un reciente estudio en el que se demostró que una serie de genes de células sanguíneas periféricas de pacientes de EM mostraban una expresión diferencial comparados con los pertenecientes a gemelos sanos (Särkijärvi S. y col., *BMC Medical Genetics*, 7:11 (2006)).

15 El análisis de los datos estadísticos reveló 360 genes que estaban regulados al alza o a la baja al menos en un factor de 2 en todos los pacientes tras el tratamiento con IVIG. El efecto del tratamiento con IVIG adquirió mayor prominencia a los 21 días del comienzo del tratamiento con IVIG. Los genes cuya expresión se ve principalmente afectada por el tratamiento con IVIG incluyeron aquellos que codifican proteínas que regulan el ciclo celular, la transducción de la señal, transcripción, inflamación, interacciones intracelulares y apoptosis. Es probable que estos procesos participen en la patogénesis de la EM. Cuando comparamos los efectos de la expresión génica causada por el tratamiento con el tratamiento con IVIG con los efectos causados por el tratamiento con IVMP, encontramos 20 583 genes que se regulaban diferencialmente tras el tratamiento con IVMP. La mayor parte de estos genes tenía su expresión alterada el sexto día, en comparación con el día 0 con posterioridad al comienzo de la terapia. Estos resultados indican que la IVMP podría ser un fármaco de acción más rápida que la IVIG.

25 Se han identificado 17 genes cuya expresión se modificó de forma significativa en ambos grupos de pacientes. La mayor parte de las proteínas codificadas por estos 17 genes regulan el ciclo celular. Estos resultados sugieren firmemente que la regulación de la proliferación celular, y más concretamente la regulación de la proliferación de las células T, es un mecanismo de acción que tienen en común ambos fármacos. Estos resultados concuerdan con los datos publicados, que indican que la IVIG suprime la proliferación de las células T activadas cuando se administran a pacientes con EM (Andersson U. y col., *Immunol Rev*, 139:21-42 (1994); Bayry J. y col., *Intravenous immunoglobulin in autoimmune disorders: An insight into the immunoregulatory mechanisms*).

30 Un importante mecanismo de acción de la IVIG en la EM parece ser la modulación de la expresión de la quimioquina. Esta conclusión se basa en el descubrimiento de que una serie de genes que codifican quimioquinas (CXCL3, CXCL5, CCL13 y XCL2) tienen una expresión diferente al recibir tratamiento con IVIG. Estos cambios en la expresión del gen no se han detectado en pacientes tratados con IVMP. Por tanto, se cree que la modulación de la expresión de la quimioquina en células T periféricas podría ser un mecanismo de acción específico de la IVIG en EM. Diversos estudios han demostrado que las quimioquinas y los receptores de quimioquina participan en la patogénesis de la EM (Trebst C. y Ransohoff R.M., *Arch Neurol*, 58:1975-80 (2001)). Se ha demostrado que las quimioquinas median en el paso de las células inmunes que atraviesan la barrera hematoencefálica y a la hora de dirigir la migración de las células inmunes a los emplazamientos de lesiones activas (Szcucinski A. y Losy J., *Acta Neurol Scand*, 115:137-146 (2007)). Además, se detectaron quimioquinas en lesiones activas y su presencia era

muy numerosa en el líquido cerebroespinal de pacientes aquejados de EM durante la recaída (Sindern E. y col., *J Neuroimmunol*, 131:186-90 (2002)). Se sabe que dos de las quimioquinas (CXCL3 y CXCL5) que estaban significativamente reguladas a la baja en nuestro estudio interactúan específicamente con el receptor de la quimioquina CXCR2 (Omari K. y col., *Brain*, 128:1003-1015 (2005)). En anteriores estudios se ha demostrado que la CXCR2 no sólo se expresa en células sanguíneas periféricas, como granulocitos, monocitos o linfocitos (Murdoch C. y col., *Brain*, 128:1003-1015 (2005(?)); Murphy P.M. y col., *Pharmacol Rev.*, 52:145-76 (2000)) sino también en los oligodendrocitos cerebrales. Los oligodendrocitos son fundamentales para la mielinización de los axones en la sustancia blanca del Sistema Nervioso Central, así como para la remielinización de los axones durante la inflamación en EM (Blakemore W.F., *J Neurol Sci.*, (2007)). Se ha demostrado recientemente que la CXCR2 expresada en los oligodendrocitos es esencial para el desarrollo y el mantenimiento del linaje del oligodendrocito, la mielinización y la sustancia blanca en el SNC de los invertebrados (Tsai H.H. y col., *Cell*, 110:373-83 (2002); Padovani-Claudio D. y col., *Glia*, 54:471-483 (2006)). La regulación del desarrollo y la migración de los oligodendrocitos depende de la expresión localizada de la quimioquina CXCL1 y de su interacción con la CXCR2 expresada en células precursoras del oligodendrocito y en los propios oligodendrocitos (Padovani-Claudio D. y col., *Glia*, 54:471-483 (2006)). Cualquier evento que interrumpa la interacción entre CXCL1 y CXCR2 expresado en los oligodendrocitos o la señalización inducida por esta interacción podrían causar, por tanto, una interrupción del proceso de remielinización de pacientes que sufren EM. En función de estos descubrimientos, se proponen las siguientes hipótesis para un nuevo mecanismo de acción de la IVIG en pacientes aquejados de EMRR durante la recaída. Las células periféricas T y los monocitos penetran en el SNC en respuesta a las quimioquinas producidas por la inflamación cerebral. La barrera hematoencefálica alterada (Man S. y col., *Brain Pathol.*, 17:243-50 (2007)) facilita este proceso. Tanto las células T como los monocitos producen quimioquinas en el cerebro que interfieren con la estrechamente regulada actividad de las células precursoras de oligodendrocitos y los oligodendrocitos. Esta interferencia podría estar causada por una desensibilización del receptor CXCR2 expresada en los oligodendrocitos o por una interferencia con la interacción entre la CXCL1 y CXCR2 expresadas localmente en los oligodendrocitos. La IVIG regula a la baja la expresión de las quimioquinas en las células periféricas T, en los monocitos o en ambos. Por consiguiente, se impediría que las quimioquinas producidas por estas células interfiriesen en la función de los oligodendrocitos y se restablecería el proceso natural remielinización inducido por los oligodendrocitos. Queda por demostrar si la IVIG modularía no solamente la expresión de las quimioquinas en células periféricas T, sino también la expresión de las quimioquinas en células del SNC, por ejemplo, en los astrocitos.

La intención del estudio era identificar los genes con más probabilidades de ser asociados a las respuestas de las células T en caso de EM. La estrategia utilizada para la selección positiva de las células no excluye la posibilidad de que algunos de los genes identificados se asocien con monocitos periféricos en lugar de con células T. Esto ha de tenerse en cuenta a la hora de interpretar los datos anteriores. Los genes en los que se ha descubierto una expresión diferencial al recibir tratamiento con IVIG serán confirmados en un segundo ensayo clínico con un grupo de estudio más amplio. Los genes diferencialmente expresados pueden utilizarse como marcadores de diagnóstico de la eficacia terapéutica el tratamiento con IVIG. Asimismo, algunas de las proteínas codificadas por los genes de interés proporcionarán unas dianas adecuadas para el desarrollo de fármacos en el futuro.

ID SEC. Nº: 1: Quimioquina de Homo sapiens (motivo C-X-C) ligando 5 (CXCL5) (NM_002994)

gtgcagaagg	cacgaggaag	ccacagtgct	cgggatcctc	caatcttgcg	tcttccaatc
tccgctcctc	cacccagttc	aggaaccgcg	gaccgctcgc	agcgcctcct	tgaccactat
gagcctcctg	tccagccgcg	cggcccgtgt	ccccggtcct	tcgagctcct	tgtgcgcgct
gttggtgctg	ctgctgctgc	tgacgcagcc	agggcccac	gccagcgcgtg	gtcctgcccg
tgctgtgttg	agagagctgc	gctgcggttg	tttacagacc	acgcaaggag	ttcatcccaa
aatgatcagt	aatctgcaag	tgttcgccat	agggccacag	tgctccaagg	tggagtggtg
agcctccctg	aagaacggga	aggaaatttg	tcttgatcca	gaagcccctt	ttctaagaa
agtcattccag	aaaattttgg	acggtggaaa	caaggaaaac	tgattaagag	aaatgagcac
gcatggaaaa	gtttcccagt	cttcagcaga	gaagttttct	ggaggtctct	gaacccaggg
aagacaagaa	ggaaagattt	tgttgttgtt	tgtttatttg	ttttccagt	agttagcttt
cttcctggat	tcttcacttt	gaagagtgtg	aggaaaacct	atgtttgccg	cttaagcttt
cagctcagct	aatgaagtgt	ttagcatagt	acctctgcta	tttgctgta	ttttatctgc
tatgctattg	aagttttggc	aattgactat	agtgtgagcc	aggaatcact	ggctgttaat
ctttcaagt	gtcttgaatt	gtaggtgact	attatatttc	caagaaatat	tctttagat
attaactgag	aaggctgtgg	atttaatgtg	gaaatgatgt	ttcataagaa	ttctgttgat
ggaaatacac	tgttatcttc	acttttataa	gaaataggaa	atattttaat	gtttcttggg
gaatatgtta	gagaatttcc	ttactcttga	ttgtgggata	ctatttaatt	atctcacttt
agaaagctga	gtgtttcaca	ccttatctat	gtagaatata	tttccttatt	cagaatttct
aaaagtttaa	gttctatgag	ggctaataatc	ttatcttctc	ataattttag	acattcttta
tcttttagt	atggcaaact	gccatcattt	acttttaaac	tttgatttta	tatgctattt
attaagtatt	ttattaggag	taccataaatt	ctggtagcta	aatatataat	ttagatagat
gaagaagcta	gaaaacaggg	aaattcctga	ctgctagttt	atatagaaat	gtattctttt
agtttttaa	gtaaaggcaa	acttaacaat	gacttgtact	ctgaaagttt	tggaaacgta
ttcaacaat	ttgaatataa	atttatcatt	tagttataaa	aatataatgc	gcatcctcg
aggccctagc	atcttctcct	ggatagggga	ccagagagag	cttggaatgt	taaaaacaaa
acaaaacaaa	aaaaaacaag	gagaagtgtg	ccaagggatg	tcaatttttt	atccctctgt
atgggttaga	ttttccaaaa	tcataatttg	aagaaggcca	gcatttatgg	tagaatatat
aattatata	aaggtggcca	cgctggggca	agttccctcc	ccactcacag	ctttggcccc
ttcacagag	tagaacctgg	gttagaggat	tgcaagaagc	gagcggcagc	ggggagggca
gggaagatgc	ctgtcgggtt	tttagcacag	ttcatttcac	tgggattttg	aagcatttct
gtctgaatgt	aaagcctggt	ctagtctggt	tgggacacac	tggggttggg	gggtggggaa
gatgcggtaa	tgaaacgggt	tagtcagtgt	tgtcttaata	tcttgataa	tgctgtaaag
tttattttta	caaatatttc	tgtttaagct	atctcacctt	tgtttgaaa	tcttccctt
ttaaagagaa	aatgtgacac	ttgtgaaaag	gcttgttaga	aagctcctcc	ctttttttct
ttaaaccttt	aaatgacaaa	cctaggtaat	taatggttgt	gaatttctat	ttttgctttg
tttttaatga	acatttgtct	ttcagaatag	gattctgtga	taatatttaa	atggcaaaaa
caaaacataa	ttttgtgcaa	ttaacaaagc	tactgcaaga	aaaataaaac	atctcttggt
aaaaacgtat	gtatttatat	attatatatt	tatatataat	atatattata	taatttagcat
tgctgagctt	tttagatgcc	tattgtgtat	cttttaaagg	ttttgacct	tttgttatga
gtaattacat	atatattaca	ttcactatat	taaaattgta	ctttttact	atgtgtctca
ttggttcata	gtctttattt	tgtcctttga	ataaacatta	aaagatttct	aaacttcaaa
aaaaaaaaaa	aaaaa				

ID SEC. Nº: 2: Quimioquina de Homo sapiens (motivo C-X-C) ligando 6 (CXCL5) (NP_002985.1)

MSLLSSRAARVPGPSSSLCALLVLLLLLTQPGPIASAGPAAAVLRELRCVCLQTTQGVHPKMI SNLQVFAIGPQC
SKVEWASLKNKEICLDPEAPFLKKVIQKILDGGNKEN

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Baxter International Inc. Baxter Healthcare S.A.

<120> IVIG modulation of chemokines for treatment of multiple sclerosis, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease

<130> BAXBF/P45332EPdiv2

10 <150> US 60/955610

<151> 2007-08-13

<160> 2

ES 2 477 292 T3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2475

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 1

gtgcagaagg cacgaggaag ccacagtgct cgggatcctc caatcttcgc tcctccaatc	60
tccgctcctc caccagttc aggaacccgc gaccgctcgc agcgctctct tgaccactat	120
gagcctcctg tccagccgcg cggcccgtgt ccccggctct tcgagctcct tgtgcgcgct	180
gttggtgctg ctgctgctgc tgacgcagcc agggcccatc gccagcgctg gtctcgccgc	240
tgctgtgttg agagagctgc gctgcgtttg tttacagacc acgcaaggag ttcaccccaa	300
aatgatcagt aatctgcaag tgttcgccat aggccacag tgctccaagg tggaagtgg	360
agcctccctg aagaacggga aggaaatttg tcttgatcca gaagcccctt ttctaaagaa	420
agtcacccag aaaatthttg acggtggaaa caaggaaaac tgattaagag aatgagcac	480
gcatggaaaa gtttcccagt cttcagcaga gaagtthttct ggaggtctct gaaccaggg	540
aagacaagaa ggaaagattt tgttgttgtt tgtttatttg tttttccagt agttagcttt	600
cttcctggat tcctcacttt gaagagtgtg aggaaaacct atgthttgcc cttaaagcttt	660
cagctcagct aatgaagtgt ttagcatagt acctctgcta tttgctgtha ttttatctgc	720
tatgctattg aagthttggc aattgactat agtgtgagcc aggaatcact ggctgthaat	780
ctttcaaagt gtcttgaatt gtaggtgact atttatthtc caagaaatat tccttaagat	840
attaactgag aaggctgtgg atttaatgtg gaaatgatgt ttcataagaa ttctgttgat	900
ggaaatacac tgthtatctc actthttataa gaaataggaa ataththtaat gthttcttggg	960
gaatatgtha gagaaththcc ttactcttga ttgtgggata ctaththtaatt atthcactth	1020
agaaagctga gtgthttcaca ccttatctat gtagaatata thtcctthatt cagaaththct	1080
aaaagthtaa gthctatgag ggctaataatc ttatctthcct ataaththtag acathctthta	1140
tctththtagt atggcaaact gccatcathc actththaaac thtgaththta tatgctathh	1200
attaagtatt ttattaggag taccataath ctggtagcta aatathatatt thagathagat	1260

ES 2 477 292 T3

gaagaagcta gaaaacaggc aaattcctga ctgctagttt atatagaaat gtattctttt 1320
 agttttttaa gtaaaggcaa acttaacaat gacttgtact ctgaaagttt tggaaacgta 1380
 ttcaaacaat ttgaatataa atttatcatt tagttataaa aatatatagc gacatcctcg 1440
 aggccctagc atttctcctt ggatagggga ccagagagag cttggaatgt taaaaacaaa 1500
 acaaaacaaa aaaaaacaag gagaagttgt ccaagggatg tcaatttttt atccctctgt 1560
 atgggttaga ttttcaaaa tcataatttg aagaaggcca gcatttatgg tagaatatat 1620
 aattatatat aaggtggcca cgctggggca agttccctcc cactcacag ctttgcccc 1680
 tttcacagag tagaacctgg gttagaggat tgcagaagac gagcggcagc ggggagggca 1740
 ggggaagatgc ctgtcgggtt tttagcacag ttcatttcac tgggattttg aagcatttct 1800
 gtctgaatgt aaagcctggt ctagtcctgg tgggacacac tgggggtggg ggtgggggaa 1860
 gatgcggtaa tgaaaccggt tagtcagtgt tgtcttaata tccttgataa tgctgtaaag 1920
 tttattttta caaatatttc tgtttaagct atttcacctt tgtttggaaa tccttccctt 1980
 ttaaagagaa aatgtgacac ttgtgaaaag gcttgtagga aagctcctcc ctttttttct 2040
 ttaaaccttt aaatgacaaa cctaggtaat taatggttgt gaatttctat ttttgctttg 2100
 tttttaatga acatttgtct ttcagaatag gattctgtga taatatttaa atggcaaaaa 2160
 caaaacataa ttttgtgcaa ttaacaaagc tactgcaaga aaaataaaac atttcttggg 2220
 aaaaacgtat gtatttatat attatatatt tatatataat atatattata tatttagcat 2280
 tgctgagctt tttagatgcc tattgtgtat cttttaaagg ttttgaccat tttgttatga 2340
 gtaattacat atatattaca ttcactatat taaaattgta cttttttact atgtgtctca 2400
 ttggttcata gtctttattt tgtcctttga ataaacatta aaagatttct,aaacttcaaa 2460
 aaaaaaaaaa aaaaa 2475

- <210> 2
- <211> 113
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 2

Met Ser Leu Leu Ser Ser Arg Ala Ala Arg Val Pro Gly Pro Ser Ser
 1 5 10 15

Ser Leu Cys Ala Leu Leu Val Leu Leu Leu Leu Leu Thr Gln Pro Gly
 20 25 30

Pro Ile Ala Ser Ala Gly Pro Ala Ala Ala Val Leu Arg Glu Leu Arg
 35 40 45

Cys Val Cys Leu Gln Thr Thr Gln Gly Val His Pro Lys Met Ile Ser
 50 55 60

Asn Leu Gln Val Phe Ala Ile Gly Pro Gln Cys Ser Lys Val Glu Trp
 65 70 75 80

Ala Ser Leu Lys Asn Gly Lys Glu Ile Cys Leu Asp Pro Glu Ala Pro
 85 90 95

Phe Leu Lys Lys Val Ile Gln Lys Ile Leu Asp Gly Gly Asn Lys Glu
 100 105 110

Asn

REIVINDICACIONES

1. Método para verificar la eficacia de un tratamiento intravenoso con inmunoglobulina (IVIG) de exacerbaciones agudas de esclerosis múltiple recurrente-remitente en un sujeto, comprendiendo el método los pasos de:
 - 5 (a) Poner en contacto una primera muestra biológica del sujeto tratado con IVIG con un reactivo que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico de quimioquina (motivo C-X-C) ligado 5 (CXCL5);
 - (b) Medir la expresión génica de CXCL5;
 - 10 (c) Comparar la expresión génica de CXCL5 en la primera muestra procedente del sujeto tratado con IVIG con la expresión génica del CXCL5 presente en una muestra de referencia procedente del sujeto obtenida con anterioridad al tratamiento con IVIG; y
 - (d) Determinar si el CXCL5 está o no sobreexpresado o infraexpresado en la muestra procedente del sujeto tratado con IVIG en comparación con la expresión génica del marcador en la muestra de referencia, verificando así la eficacia del tratamiento con IVIG de la esclerosis múltiple en el sujeto.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el reactivo es un ácido nucleico.
3. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el reactivo es un oligonucleótido.
4. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el reactivo es un conjunto de cebadores de PCR RT.
5. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra es una muestra de sangre.
- 20 6. Método según la reivindicación 5, caracterizado porque la muestra de sangre comprende células T.
7. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra es líquido cerebroespinal.

Fig. 1

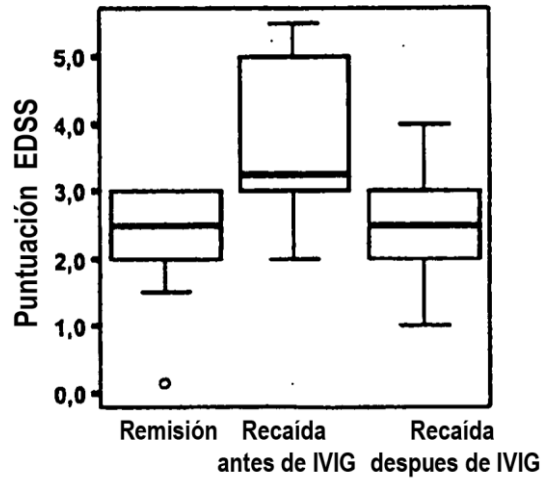


Fig. 2 A-B

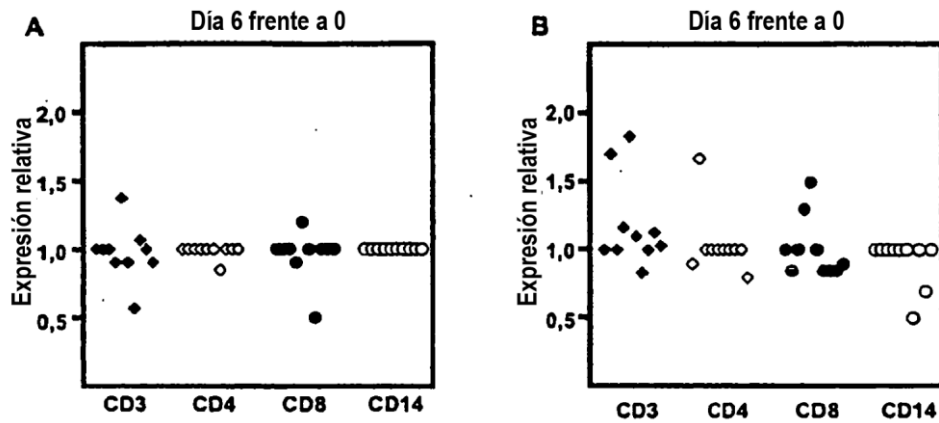


Fig. 3 A-D

