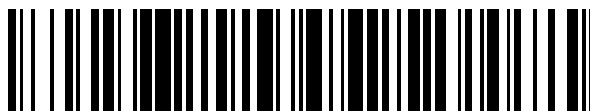


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 834**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2010** **E 10825084 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014** **EP 2492353**

54 Título: **Biomarcadores para predecir el efecto terapéutico en terapia de hiposensibilización**

30 Prioridad:

23.10.2009 JP 2009244965

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.09.2014

73 Titular/es:

**TOKYO METROPOLITAN INSTITUTE OF
MEDICAL SCIENCE (100.0%)
2-1-6, Kamikitazawa Setagaya-ku
Tokyo 156-8506, JP**

72 Inventor/es:

**HIROI, TAKACHIKA y
OKUBO, KIMIHIRO**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 498 834 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

Biomarcadores para predecir el efecto terapéutico en terapia de hiposensibilización

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un biomarcador para detectar la eficacia de la inmunoterapia con alérgenos tras realizar la terapia en un paciente con una alergia inmediata (de tipo I), tal como alergia al polen.

10 Técnica anterior

Para tratar trastornos de alergia, normalmente alergias al polen, se han realizado terapias basadas en síntomas en las que se administra un fármaco antialérgico o similar. En estas circunstancias, se han usado inmunoterapias para tratar la causa subyacente (documento no patente 1). En la actualidad, en Japón, la inmunoterapia con alérgenos se realiza como cuidados médicos garantizados mediante inyección subcutánea de un extracto antigénico causante, mientras que en Europa se ha realizado inmunoterapia con alérgenos sublingual durante algunos años mediante inmunización introduciendo unas gotas de un extracto antigénico en la boca, debajo de la lengua (documentos no patente 2 y 3).

No obstante, las inmunoterapias con alérgenos existentes requieren un tratamiento prolongado de dos o tres años, con independencia de la inyección subcutánea o del método sublingual, que, en función de los resultados del tratamiento, puede suponer cargas temporales y económicas enormes para el paciente.

Documentos de la técnica anterior

Documentos no patente

[Documento no patente 1] Rebien W. et al., Eur J Pediatr. 1982 Jul;138(4):341-4.

[Documento no patente 2] Passalacqua G. et al., Canonica GW. BioDrugs. 2001;15(8):509-19. Revisión.

[Documento no patente 3] Guez S et al., Allergy. 2000 Apr; 55(4):369-75.

Sumario de la invención**Problemas que ha de resolver la invención**

Con el fin de reducir la carga, incluíos los gastos médicos, sobre los pacientes, es necesario buscar un biomarcador que prediga la eficacia terapéutica de la inmunoterapia con alérgenos. Por tanto, la presente invención tiene un objetivo de proporcionar un biomarcador para detectar su la inmunoterapia con alérgenos es o no eficaz cuando se administra a un paciente que sufre una alergia inmediata (de tipo I) tal como una alergia al polen.

Medios para resolver los problemas

Con el fin de resolver los problemas anteriormente descritos, los presentes inventores han realizado intensas investigaciones como resultado de las cuales se ha descubierto que variaciones en el número de copias de determinados genes son útiles para detectar la eficacia de la inmunoterapia con alérgenos, de modo que se realiza la presente invención.

Por tanto, la presente invención es del siguiente modo.

Un método para detectar la eficacia de la inmunoterapia con alérgenos para una alergia inmediata en un sujeto, comprendiendo el método las etapas de: detectar una variación del número de copias de al menos un gen seleccionado del siguiente grupo de genes en una muestra que se va a analizar obtenida del sujeto; comparar el resultado obtenido de detectar la variación del número de copias con datos de la variación del número de copias del mismo gen de la población parental para correlacionar con la eficacia de la inmunoterapia con alérgenos:

<Grupo de genes>

AGXT2L2, AZGP1, CAV3, CEP72, CUL4A, CXCR7, C12orf60, C16orf48, C19orf34, DNAJB8, FTH1, GEMIN4, GIGYF2, GJC3, HTT, ITCH, MARK2, METT10D, NAV3, NOB1, PAFAH2, PLEKHG4B, PPFIA1, SCARNA11, SDF2L1, SMPD3, SNORA44, SRP14, ST6GALNAC1, SULF2, TMED6, TYRP1, WFDC13, ZNFX1, NCAM2, PCDH17, CHODL, BTG3, DIAPH3, GBA3, IFRD1, KCNT2, THOC7, TMEM168, BST1, C7orf53, CD38, DCUN1D1, FGFBP1, FOXP2, GLRB, GTF2B, HSP90AB2P, MCCC1, MDFIC, ODF2L, PDGFC, SEP15, SH3GLB1, TDRD3, YEATS2, CCDC127, C14orf180, SIVA1, TNFRSF14, AHNK2, C14orf79, LOC25845, PLD4, GPR132, LOC389257, BRF1 y ADSSL. De acuerdo con la presente invención, al resultado de detectar la variación del número de copias se puede correlacionar con la eficacia de la inmunoterapia con alérgenos en base a cualquiera de los siguientes criterios de juicio (a) a (d) o una combinación de los mismos:

<Criterios de juicio>

(a) la inmunoterapia con alérgenos es eficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en NAV3, TYRP1, NCAM2, PCDH17, CHODL, BTG3, DIAPH3, GBA3, IFRD1, KCNT2, THOC7, TMEM168, BST1, C7orf53, CD38, DCUN1D1, FGFBP1, FOXP2, GLRB, GTF2B, HSP90AB2P, MCCC1, MDFIC, ODF2L, PDGFC, SEP15, SH3GLB1, TDRD3 y YEATS2 es menor que el número de copias más frecuente (por ejemplo, 2) del mismo gen de la población parental, preferentemente 1;

(b) la inmunoterapia con alérgenos es eficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en AGXT2L2, AZGP1, CAV3, CEP72, CUL4A, CXCR7, C19orf34, DNAJB8, FTH1, GEMIN4, GIGYF2, GJC3, ITCH, HTT, MARK2, METT10D, PAFAH2, PLEKHG4B, PPFIA1, SCARNA11, SDF2L1, SNORA44, ST6GALNAC1, SULF2, WFDC13, ZNFX1, CCDC127, C14orf180, SIVA1, TNFRSF14, AHNAK2, C14orf79, LOC25845, PLD4, GPR132, LOC389257, BRF1 y ADSSL1 es mayor que el número de copias más frecuente (por ejemplo, 2) del mismo gen de la población parental, preferentemente 3;

(c) la inmunoterapia con alérgenos es ineficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en AGXT2L2, CAV3, CEP72, CUL4A, CXCR7, C16orf48, C19orf34, DNAJB8, FTH1, GEMIN4, GIGYF2, GJC3, HTT, ITCH, MARK2, METT10D, NOB1, PAFAH2, PLEKHG4B, SCARNA11, SDF2L1, SMPD3, SNORA44, SRP14, ST6GALNAC1, SULF2, TMED6, WFDC13, ZNFX1, CCDC127, C14orf180, SIVA1, TNFRSF14, AHNAK2, C14orf79, LOC25845, PLD4, GPR132, LOC389257, BRF1 y ADSSL1 es menor que el número de copias más frecuente (por ejemplo, 2) del mismo gen de la población parental, preferentemente 1; y

(d) la inmunoterapia con alérgenos es ineficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en C12orf60, NAV3, TYRP1, NCAM2, PCDH17, CHODL, BTG3, DIAPH3, GBA3, IFRD1, KCNT2, THOC7, TMEM168, BST1, C7orf53, CD38, FGFBP1, FOXP2, GLRB, GTF2B, HSP90AB2P, MDFIC, ODF2L, PDGFC, SEP15, SH3GLB1 y TDRD3 mayor que el número de copias más frecuente (por ejemplo, 2) del mismo gen de la población parental, preferentemente 3.

Un método para detectar la eficacia de la inmunoterapia con alérgenos para una alergia inmediata en un sujeto, comprendiendo el método las etapas de: Detectar una variación del número de copias de al menos un gen seleccionado del siguiente grupo de genes en una muestra a examinar obtenida del sujeto; correlacionar el resultado obtenido de detectar la variación del número de copias con eficacia de la inmunoterapia con alérgenos en base a cualquiera de los siguientes criterios de juicio (e) a (h) o una combinación de los mismos:

(e) la inmunoterapia con alérgenos es eficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en NAV3, TYRP1, NCAM2, PCDH17, CHODL, BTG3, DIAPH3, GBA3, IFRD1, KCNT2, THOC7, TMEM168, BST1, C7orf53, CD38, DCUN1D1, FGFBP1, FOXP2, GLRB, GTF2B, HSP90AB2P, MCCC1, MDFIC, ODF2L, PDGFC, SEP15, SH3GLB1, TDRD3 y YEATS2 es 1;

(f) la inmunoterapia con alérgenos es eficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en AGXT2L2, AZGP1, CAV3, CEP72, CUL4A, CXCR7, C19orf34, DNAJB8, FTH1, GEMIN4, GIGYF2, GJC3, ITCH, HTT, MARK2, METT10D, PAFAH2, PLEKHG4B, PPFIA1, SCARNA11, SDF2L1, SNORA44, ST6GALNAC1, SULF2, WFDC13, ZNFX1, CCDC127, C14orf180, SIVA1, TNFRSF14, AHNAK2, C14orf79, LOC25845, PLD4, GPR132, LOC389257, BRF1 y ADSSL1 es 3;

(g) la inmunoterapia con alérgenos es ineficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en AGXT2L2, CAV3, CEP72, CUL4A, CXCR7, C16orf48, C19orf34, DNAJB8, FTH1, GEMIN4, GIGYF2, GJC3, HTT, ITCH, MARK2, METT10D, NOB1, PAFAH2, PLEKHG4B, SCARNA11, SDF2L1, SMPD3, SNORA44, SRP14, ST6GALNAC1, SULF2, TMED6, WFDC13, ZNFX1, CCDC127, C14orf180, SIVA1, TNFRSF14, AHNAK2, C14orf79, LOC25845, PLD4, GPR132, LOC389257, BRF1 y ADSSL1 es 1; y

(h) la inmunoterapia con alérgenos es ineficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en C12orf60, NAV3, TYRP1, NCAM2, PCDH17, CHODL, BTG3, DIAPH3, GBA3, IFRD1, KCNT2, THOC7, TMEM168, BST1, C7orf53, CD38, FGFBP1, FOXP2, GLRB, GTF2B, HSP90AB2P, MDFIC, ODF2L, PDGFC, SEP 15, SH3GLB1 y TDRD3 es 3;

De acuerdo con la presente invención, un ejemplo de inmunoterapia con alérgenos incluye una inmunoterapia con alérgenos sublingual. Ejemplos de una alergia inmediata incluyen al menos una seleccionada del grupo que consiste en alergia al polen, urticaria, alergia a alimentos, alergia a ácaros, rinitis alérgica, asma bronquial y dermatitis atópica.

Efecto de la invención

La presente invención proporciona un biomarcador que es capaz de detectar la eficacia de la inmunoterapia con alérgenos cuando la terapia se administra a un paciente que en la actualidad sufre una alergia inmediata o un sujeto que en la actualidad puede no estar sufriendo una alergia inmediata pero que puede padecerla en el futuro. Midiendo la variación del número de copias del gen obtenido del sujeto se puede analizar si la inmunoterapia con alérgenos es o no eficaz en la actualidad o lo será en el futuro. Como resultado se puede proporcionar un método de tratamiento que sea eficaz para un paciente con alergia.

Breve descripción de las figuras

[Figura 1] Un diagrama que muestra un plan para llevar a cabo inmunoterapia con alérgenos.

[Figura 2] Diagramas que muestran cambios en las condiciones iniciales durante la inmunoterapia con alérgenos

y resultados de juzgar la eficacia terapéutica.

[Figura 3] Diagramas que muestran las relaciones entre las variaciones en el número de copias y la eficacia terapéutica.

[Figura 4] Diagramas que muestran las relaciones entre las variaciones en el número de copias y la eficacia terapéutica.

[Figura 5] Diagramas que muestran las relaciones entre las variaciones en el número de copias y la eficacia terapéutica.

[Figura 6] Diagramas que muestran las relaciones entre las variaciones en el número de copias y la eficacia terapéutica.

[Figura 7] Diagramas que muestran las relaciones entre las variaciones en el número de copias y la eficacia terapéutica.

[Figura 8] Un diagrama que muestra la relación entre la variación en el número de copias y la eficacia terapéutica.

Realizaciones para llevar a cabo la invención

A continuación, la presente invención se describirá con mayor detalle.

1. Resumen general

La presente invención se refiere a un método para detectar la eficacia de la inmunoterapia con alérgenos en un paciente con alergia inmediata usando una variación del número de copias de un gen en una muestra que se va a analizar de un sujeto (paciente con alergia inmediata, sujeto sano, etc.) como índice (correlacionar con la eficacia de la inmunoterapia con alérgenos).

Los presentes inventores han examinado la eficacia terapéutica de inmunoterapia con alérgenos sublingual en pacientes con una alergia al polen de cedro y los ha agrupado en un grupo de pacientes con eficacia terapéutica significativa contra síntomas alérgicos (grupo terapéuticamente eficaz) y un grupo de pacientes sin eficacia (grupo terapéuticamente ineficaz).

Para cada grupo de pacientes se detectaron genes que se correlacionan con la eficacia terapéutica en una población parental, incluido el grupo terapéuticamente eficaz y el grupo terapéuticamente ineficaz usando una técnica denominada análisis integrado. "Análisis integrado" es un método que en conjunto agrupa los datos del estado clínico, los resultados de las pruebas sexológicas, el análisis del ARNm y el análisis de la variación del número de copias y procesa de forma exhaustiva una combinación de todos o algunos de estos términos mediante análisis estadístico. La hacerlo, los genes que se pueden usar para detectar la eficacia de la inmunoterapia con alérgenos, que son determinados genes (indicados más adelante) que tienen variaciones del número de copias que permiten la detección de si la inmunoterapia con alérgenos es eficaz o ineficaz.

Una variación del número de copias (VNC) hace referencia a una región genómica cuyo número de copias por célula difiere entre individuos en una población determinada. Una célula humana generalmente hereda dos (2 copias de) genes de las ramas paterna y materna. No obstante, el número de un determinado gen por célula puede variar de un individuo a otro, que puede ser solo una (1 copia) o tres (3 copias) o más. Dicha variación individual en un gen se denomina VNC. Por ejemplo, el número más frecuente de VNC en la población parental descrita anteriormente está representado como "N (Normal)" (VNC = N), el número de VNC menor que N se representa como "L (pérdida)" (VNC = L), y el número de mayor de N se representa como "G (Ganancia)" (VNC = G).

La VNC de un gen contenido en una muestra de un sujeto se detecta de modo que si la inmunoterapia con alérgenos es eficaz o ineficaz en el sujeto se puede juzgar antes del tratamiento dependiendo de en cual de las VNC anteriormente descritas L, N y G entra.

Por tanto, de acuerdo con la presente invención, la variación del número de copia de un gen predeterminado se analiza de modo que se correlacione el resultado del análisis con la eficacia de la inmunoterapia con alérgenos para examinar si la inmunoterapia con alérgenos es eficaz o no en el paciente con alergia inmediata.

2. Inmunoterapia con alérgenos

La inmunoterapia con alérgenos es el único tratamiento curativo entre los tratamientos para la alergia tomados en la actualidad y se refiere a una inmunoterapia que inactiva la respuesta inmunológica específica de antígeno mediante una exposición gradual a los alérgenos dentro del cuerpo. En la actualidad se conocen la inmunoterapia con alérgenos sublingual, inmunoterapia con alérgenos subcutánea y similares.

La inmunoterapia con alérgenos sublingual se caracteriza por permitir llevar a cabo la sensibilización al antígeno sin acudir al especialista y sin dolor sin la necesidad de introducir una aguja en el cuerpo (la carga del paciente es pequeña). La inmunoterapia con alérgenos sublingual se lleva a cabo depositando gotas de un extracto de antígeno debajo de la lengua para la sensibilización al antígeno, cuando se realiza la sensibilización al antígeno a diario

comenzando con concentraciones pequeñas a mayores de un modo escalonado durante el primer mes de aproximadamente dos años de duración del tratamiento, que después es seguida por la sensibilización al antígeno dos veces a la semana.

- 5 Por otro lado, la inmunoterapia con alérgenos subcutánea se caracteriza por ser dolorosa en cierta medida por
inyectar por vía subcutánea un antígeno con una aguja y requiere acudir al especialista al menos 50 veces o más
durante dos años de duración del tratamiento. Similar a la inmunoterapia con alérgenos sublingual, la inmunoterapia
con alérgenos subcutánea se lleva a cabo mediante sensibilización al antígeno durante aproximadamente dos años
de duración del tratamiento, cuando la sensibilización al antígeno se lleva a cabo a diario desde concentraciones
10 más bajas a más altas de forma escalonada durante el primer mes, seguido después por sensibilización al antígeno
dos veces a la semana.

De acuerdo con la presente invención, se puede detectar si la terapia es eficaz o no para cualquiera de las
inmunoterapias con alérgenos, pero es, preferentemente, la inmunoterapia con alérgenos sublingual la
15 inmunoterapia con alérgenos recomendada por la OMS.

3. Sujeto

Un sujeto como diana de un método de la presente invención, es decir, un paciente que sufre una alergia inmediata
20 como diana de la inmunoterapia con alérgenos para una alergia inmediata no está particularmente limitada siempre
que el paciente presente una alergia inmediata (de tipo I).

Por ejemplo, las alergias de tipo I se pueden clasificar del siguiente modo.

- 25 Clasificación basada en antígenos: alergia al polen, alergia a alimentos y alergia a ácaros.

Clasificación basada en estados patológicos: urticaria, rinitis alérgica, asma bronquial y dermatitis atópica.

Entre ellas, son preferibles las alergias al polen (alergia al polen de cedro, alergia al polen del arroz, alergia al polen
30 de ambrosía, alergia al polen de ciprés japonés etc.).

Incluso un sujeto sano puede tener el potencial de sufrir una alergia inmediata en el futuro. Por tanto, de acuerdo
con la presente invención, un sujeto sano puede ser también el sujeto aparte de los pacientes de alergia inmediata.

4. Análisis de la variación del número de copias

(1) Muestra a examinar

La muestra que se va a examinar puede ser, por ejemplo, una muestra biológica de un sujeto sano o de un paciente
40 de alergia inmediata.

La muestra que se va a examinar usada para un análisis de la variación del número de copias (VNC) puede ser, por
ejemplo, sangre, membrana mucosa de la nariz, secreción nasal, esputo o similares obtenidos del sujeto descrito
anteriormente y, preferentemente, sangre o un componente de la misma (suero, plasma etc.). Los expertos en la
45 técnica conocen métodos para obtener estas muestras biológicas o similares.

Cuando la muestra biológica que se va a usar para el análisis de la VCN es sangre, por ejemplo, las células se
extraen, preferentemente, de una muestra de sangre para preparar un lisado de la misma o extraer ARN (p. ej.,
ARNm) o ADN. La preparación de un lisado y la extracción de ADN se pueden llevar a cabo usando un método
50 conocido o un kit disponible comercialmente. Como alternativa, las células extraídas de una muestra de sangre
pueden clasificarse adicionalmente con un Clasificador Celular activado por fluorescencia (FACS), MACS (marca
registrada) o similares. Un ejemplo de las células extraídas incluye una célula inmunitaria. Ejemplos de la célula
inmunitaria incluyen linfocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, células dendríticas y células
dendríticas plasmacitoides (CDP), en las que las células CD4T, las células dendríticas y los basófilos son preferibles
55 y se ha sugerido que tienen una asociación con la alergia. Adicionalmente, la muestra puede ser ARN mensajero
(ARNm) extraído de la célula descrita anteriormente.

Cuando la muestra biológica está en forma líquida, preferentemente se diluye en, por ejemplo, un tampón o similar,
a usar para la medición de ADN.
60

La medición de la VNC se realiza, preferentemente, mediante un método de micromatriz en términos de una
operación simple.

(2) Genes

De acuerdo con la presente invención, los genes usados para detectar la eficacia de la inmunoterapia con alérgenos fueron los siguientes.

5

[Tabla 1-1]

Gen	Nombre del gen	Nº de acceso
C12orf60	Marco de lectura abierto 60 del cromosoma 12	NM_175874
SRP14	Partícula de reconocimiento de señal de 14 kDa (proteína de unión a ARN de Alu homóloga)	NM_003134
C16orf48	Marco de lectura abierto 48 del cromosoma 16	NM_032140
SMPD3	Esfingomielina fosfodiesterasa 3, membrana neutra (esfingomielinasa neutra II)	NM_018667
TMED6	Dominio de transporte de la proteína emp24 transmembrana que contiene 6	NM_144676
NOB1	Homóloga 1 de la proteína de unión NIN1/RPN12 (<i>S. cerevisiae</i>)	NM_014062
GEMIN4	Proteína 4 asociada a gcm (orgánulo nuclear)	NM_015721
SDF2L1	Factor 2 de tipo 1 derivado de células estromales	NM_022044
CAV3	Caveolina 3	NM_001234
DNAJB8	Homólogo de DnaJ_(Hsp40), subfamilia B, miembro 8	NM_153330
AZGP1	Alfa-2-glicoproteína 1, unión a cinc	NM_001185
GJC3	Proteína de unión gap, gamma 3, 30,2 kDa	NM_181538
SNORA44	ARN nuclear pequeño, caja H/ACA 44	NR_002976
PAFAH2	Factor activador de las plaquetas acetilhidrolasa 2, 40kDa	NM_000437
MARK2	Quinasa 2 reguladora de la afinidad de MAP/microtúbulos	NM_017490
FTH1	Ferritina, polipéptido pesado 1	NM_002032
PPFIA1	Proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, polipéptido f (PTPRF), Proteína de interacción (liprina), alfa 1	NM_177423
SCARNA11	ARN específico de cuerpos de Cajal pequeño 11	NR_003012

[Tabla 1-2]

NAV3	Navegador neuronal 3	NM_014903
CUL4A	Culina 4A	NM_003589
METHOD	Dominio 10 de metiltransferasa que contiene	NM_024086
ST6GALNAC1	ST6_(alfa-N-acetil-neuraminil-2,3-beta-galactosil-1,3)-N-acetilgalactosaminida_alfa-2,6-sialiltransferasa_1	NM_018414
C19orf34	Marco de lectura abierto 34 del cromosoma 19	NM_152771
GIGYF2	Proteína GYF de interacción con GRB10 2	NM_015575
CXCR7	Receptor 7 de quimiocina (motivo C-X-C)	NM_020311
ITCH	Homólogo de la proteína ligasa ubiquitina E3 itchy (ratón)	NM_031483
SULF2	Sulfatasa 2	NM_198596
WFDC13	Dominio del núcleo de cuatro disulfuros WAP 13	NM_172005
ZNFX1	Dedo de cinc, de tipo NFX1, que contienen 1	NM_021035
HTT	huntingtina	NM_002111
CEP72	Proteína del centrosoma 72 kDa	NM_018140
PLEKHG4B	Miembro 4B de la familia G (con dominio RhoGof) que contiene el dominio de homología con pleckstrina	NM_052909
AGXT2L2	Alanina glioxilato aminotransferasa 2 de tipo 2	NM_153373
TYRP1	Proteína 1 relacionada con la tirosinasa	NM_000550
CCDC127	Dominio de hélice enrollada que contiene 127	NM_145265
NCAM2	Molécula de adhesión 2 a las células neuronales	NM_001113208

PCDH17	Protocaderina 17	NM_001040429
C14orf180	Marco de lectura abierto 180 del cromosoma 14	NM_001008404
CHODL	condrolectina	NM_139134
SIVA1	Factor inductor de la apoptosis	NM_001045673
TNFRSF14	Miembro 14 de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral (mediador de entrada del virus herpes)	NM_003820
AHNAK2	Nucleoproteína 2	NM_138420
C14orf79	Marco de lectura abierto 79 del cromosoma 14	
LOC25845		NR_024158.
PLD4	Miembro 4 de la familia D de fosfolipasa	NM_178911
GPR132	Receptor 132 acoplado a proteína G	NM_013345
LOC389257	Repetición rica en leucina que contiene 14B	NM_001080478
BRF1	Homólogo de BRF1, subunidad del factor de iniciación de la transcripción IIIB de la ARN polimerasa III (<i>S. cerevisiae</i>)	XM_421405
BTG3	Familia BTG, miembro 3	NM_019290
DIAPH3	Homólogo 3 diáfano (<i>Drosophila</i>)	XM_224392
GBA3	Glucosidasa, beta, ácido 3 (citósólica)	NM_001128432
IFRD1	Regulador 1 del desarrollo relacionado con el interferón	NM_001007245

[Tabla 1-3]

KCNT2	Miembro 2, subfamilia T, de canales de potasio	NM_198503
TH0C7	Homólogo 7 del complejo TH0 (<i>Drosophila</i>)	NM_025075
TMEM168	Proteína transmembrana 168	NM_022484
ADSSL1	Adenilosuccinato sintasa de tipo 1	NM_152328
BST1	Antígeno de células estromales de la médula ósea 1	NM_004334
C7orf53	Marco de lectura abierto 53 del cromosoma 7	NM_001134468
CD38	Molécula CD38	NM_001775
DCUN1D1	DCN1, defectivo en la nedilación de culina 1, dominio que contiene 1	NM_020640
FGFBP1	Proteína 1 de unión al factor de crecimiento de fibroblastos	NM_005130
FOXP2	Caja forkhead P2	NM_001172766
GLRB	Receptor beta de la glicina	NM_000824
GTF2B	Factor de transcripción general IIB	NM_001514
HSP90AB2P	Proteína del shok térmico de 90 kDa alfa (citósólica), miembro 2 de clase B (seudogen)	NR_003132
MCCC1	Metilcrotonoil-CoA carboxilasa 1 (alfa)	NM_020166
MDFIC	Dominio inhibidor de la familia MyoD que contiene	NM_001166345
ODF2L	Fibra externa densa de colas de espermatozoide de tipo 2	NM_001007022
PDGFC	Factor C de crecimiento derivado de las plaquetas	NM_016205
SEP15	Selenoproteína de 15 kDa	NM_004261
SH3GLB1	Dominio SH3 de endofilina B1 de tipo GRB2	NM_016009
TDRD3	Dominio tudor que contiene 3	NM_001146070
YEATS2	Dominio YEATS que contiene 2	NM_018023

Los genes indicados anteriormente se extrajeron realizando un análisis integrado (véase los Ejemplos).

5

De acuerdo con la presente invención se puede usar al menos un gen entre los genes mencionados anteriormente.

Adicionalmente, la información sobre las secuencias de nucleótidos de los genes está fácilmente accesible con los números de acceso indicados anteriormente.

(3) Técnica de análisis de la variación del número de copias

Ejemplos de un método para analizar una variación VNC de un gen de acuerdo con la presente invención incluyen métodos conocidos, tales como un método de micromatrices y un método de secuenciación, y, por ejemplo, también pueden usar un kit disponible comercialmente (por ejemplo, "Agilent SurePrint G3 Human CNV microarray kit 2 x 400K" (Agilent Technologies)).

Una micromatriz de ADN tiene un extremo de sondas nucleotídicas fijado sobre un soporte en una matriz e incluye un circuito de ADN, un GeneChip, un microcircuito, una matriz de esferas y similares. Un ejemplo de un ensayo de micromatriz de ADN, tal como un circuito de ADN, incluye un ensayo GeneChip Affymetrix). La técnica de GeneChip usa una micromatriz de escala pequeña de sondas oligonucleotídicas unidas a un circuito.

Un método de secuenciación es un método para analizar la presencia o ausencia de una variación del número de copias amplificando una región que incluya la variación del número de copias mediante PCR y secuenciando la secuencia de ADN con un Terminador de Pigmentos o similares (Sambrook, Fritsch and Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2ª Edición (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press).

De acuerdo con un método de detección como el ilustrado anteriormente, se usa un oligonucleótido preparado para incluir un gen de interés como sonda o cebador. De acuerdo con lo anterior, la presente invención también proporciona un oligonucleótido preparado para incluir cada uno de los genes de interés.

El cebador oligonucleotídico o sonda oligonucleotídica diseñado como se ha descrito anteriormente se puede sintetizar químicamente mediante una técnica o método conocido pero, en general, se sintetizan usando un sintetizado químico disponible comercialmente.

Además, la operación se puede automatizar añadiendo a la sonda un marcador fluorescente (p. ej., FITC, FAM, VIC, pigmento Redmond o similar) y un inactivador para el marcador fluorescente.

(4) Criterios de juicio

Los resultados de la detección se pueden correlacionar con la eficacia de la inmunoterapia con alérgenos en base a cualquiera de los criterios de juicio (a) a (d) siguientes o una combinación de los mismos:

(a) la inmunoterapia con alérgenos es eficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en NAV3, TYRP1, NCAM2, PCDH17, CHODL, BTG3, DIAPH3, GBA3, IFRD1, KCNT2, THOC7, TMEM168, BST1, C7orf53, CD38, DCUN1D1, FGFBP1, FOXP2, GLRB, GTF2B, HSP90AB2P, MCCC1, MDFIC, ODF2L, PDGFC, SEP15, SH3GLB1, TDRD3 y YEATS2 es menor que el número de copias más frecuente (por ejemplo, 2) del mismo gen de la población parental, preferentemente 1;

(b) la inmunoterapia con alérgenos es eficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en AGXT2L2, AZGP1, CAV3, CEP72, CUL4A, CXCR7, C19orf34, DNAJB8, FTH1, GEMIN4, GIGYF2, GJC3, ITCH, HTT, MARK2, METT10D, PAFAH2, PLEKHG4B, PPFIA1, SCARNA11, SDF2L1, SNORA44, ST6GALNAC1, SULF2, WFDC13, ZNFX1, CCDC127, C14orf180, SIVA1, TNFRSF14, AHNK2, C14orf79, LOC25845, PLD4, GPR132, LOC389257, BRF1 y ADSSL1 es mayor que el número de copias más frecuente (por ejemplo, 2) del mismo gen de la población parental, preferentemente 3;

(c) la inmunoterapia con alérgenos es ineficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en AGXT2L2, CAV3, CEP72, CUL4A, CXCR7, C16orf48, C19orf34, DNAJB8, FTH1, GEMIN4, GIGYF2, GJC3, HTT, ITCH, MARK2, METT10D, NOB1, PAFAH2, PLEKHG4B, SCARNA11, SDF2L1, SMPD3, SNORA44, SRP14, ST6GALNAC1, SULF2, TMED6, WFDC13, ZNFX1, CCDC127, C14orf180, SIVA1, TNFRSF14, AHNK2, C14orf79, LOC25845, PLD4, GPR132, LOC389257, BRF1 y ADSSL1 es menor que el número de copias más frecuente (por ejemplo, 2) del mismo gen de la población parental, preferentemente 1; y

(d) la inmunoterapia con alérgenos es ineficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en C12orf60, NAV3, TYRP1, NCAM2, PCDH17, CHODL, BTG3, DIAPH3, GBA3, IFRD1, KCNT2, THOC7, TMEM168, BST1, C7orf53, CD38, FGFBP1, FOXP2, GLRB, GTF2B, HSP90AB2P, MDFIC, ODF2L, PDGFC, SEP15, SH3GLB1 y TDRD3 mayor que el número de copias más frecuente (por ejemplo, 2) del mismo gen de la población parental, preferentemente 3.

En el presente documento, los términos "considerablemente eficaz" y "eficaz" son sinónimos.

Los expertos en la técnica pueden determinar adecuadamente cual de los criterios de juicio (a) a (d) debería ordenar un gen diana usado con la presente invención tras la correlación con el número de copias del gen con eficacia de la inmunoterapia con alérgenos. Por ejemplo, los genes diana de la población parental de los pacientes sometidos a tratamiento de hiposensibilización o una subpoblación extraída de la población parental se clasifican en cuatro grupos en base a sus números de copias (si la VNC es L o G) y la eficacia terapéutica (considerablemente eficaz o ineficaz). Después, para los grupos con una VCN de L o G se calcula la diferencia entre el número de personas pertenecientes al grupo considerablemente eficaz y el número de personas pertenecientes al grupo ineficaz. Una gran diferencia significa que se puede realizar un juicio con respecto a qué VNC proporciona una eficacia

considerable o ineficacia en la eficacia terapéutica.

Por ejemplo, en el Ejemplo 1, mirando la VNC del gen GEMIN4 (Tabla 9) de 25 pacientes extraídos de la población parental de los pacientes tratados, 8 pacientes cuya eficacia terapéutica fue ineficaz tenían una VNC de 1, mientras que el número de pacientes cuya eficacia terapéutica fue considerablemente eficaz con una VNC de 1 fue cero (0). Por otro lado, 12 pacientes cuya eficacia terapéutica fue considerablemente eficaz tenían una VNC de 3 mientras que el número de pacientes cuya eficacia terapéutica fue ineficaz con una VNC de 2 fue de solo uno. La diferencia entre el número de pacientes considerablemente eficaces con una VNC de 1 y el número de pacientes ineficaces con VNC de 1 es 0-8. Además, la entre el número de pacientes considerablemente eficaces con una VNC de 3 y el número de pacientes ineficaces con VNC de 1 es $12-1=11$. Cuando el valor absoluto de esta diferencia suma al menos un 8% o más, preferentemente un 12% o más y, más preferentemente, un 25% o más de los pacientes sometidos al cálculo, el gen se puede incluir en los genes diana que se pueden usar para juzgar la eficacia considerable o la ineficacia. En el ejemplo descrito más tarde, ya que se analizaron 24 personas del grupo considerablemente eficaz y 25 del grupo ineficaz, se puede usar un gen como gen diana para juzgar eficacia considerable o ineficacia cuando la diferencia en el número de pacientes es del 8% o más del número total de los pacientes, es decir dos o más personas ($24 \times 0,08 \approx 2$ o $25 \times 0,08 = 2$). El juicio puede ser "considerablemente eficaz" cuando el resultado obtenido restando el número de pacientes ineficaces del número de pacientes considerablemente eficaces es positivo e "ineficaz" cuando es negativo. En el caso en el que el número de pacientes considerablemente eficaces se resta del número de los pacientes ineficaces, los resultados del juicio basados en el valor positivo o negativo serían al contrario.

La presente invención también puede calcular la diferencia entre el número de pacientes eficaces y el número de pacientes ineficaces de un modo más estricto. Aunque el cálculo de la diferencia se realizó sin considerar a los pacientes con una VNC de N en el ejemplo descrito anteriormente, el cálculo también se puede realizar considerando a los pacientes con una VNC de N. No obstante, dado que el número de pacientes con una VNC de N no sirve como criterio para clasificar los genes según los criterios de juicio, se considera como valor de fondo y, por tanto, preferentemente, una proporción predeterminada, por ejemplo 50% o más, 60% o más, 70% o más, 80% o más, 90% o más o el número completo (100%) de pacientes en la población parental o la subpoblación se resta de la población parental. En este caso, cuando el número de pacientes resultante de la resta de los pacientes pertenecientes a la VNC= N es negativa, el paciente de VNC= N calcula como 0 (cero). Este valor se usa como un valor de corrección ("VNC= N valor de corrección"), por ejemplo en el cálculo siguiente.

Los índices de eficacia considerable se calculan mediante la siguiente fórmula de cálculo en la que VNC de L y G se representan como "VNC= L" y "VNC= G", respectivamente.

(1)

Índice de eficacia considerable con VNC= L

$$\left\{ \left(\frac{\text{Número de casos considerablemente eficaces con VNC = L}}{\text{Número de personas con una VNC = L + VNC = N}} \right) - \left(\frac{\text{Número de casos ineficaces con una VNC = L}}{\text{Número de personas con una VNC = L + VNC = N}} \right) \right\} \times 100$$

(2)

Índice de eficacia considerable con VNC= G

$$\left\{ \left(\frac{\text{Número de casos considerablemente eficaces con VNC = G}}{\text{Número de personas con una VNC = L + VNC = N}} \right) - \left(\frac{\text{Número de casos ineficaces con una VNC = G}}{\text{Número de personas con una VNC = L + VNC = N}} \right) \right\} \times 100$$

(3) Cuando el valor obtenido en (1) o (2) anterior es igual o superior al valor del criterio (número positivo), el gen objetivo del cálculo se selecciona como gen marcador para la eficacia considerable, mientras que cuando el valor es igual o inferior al valor del criterio (número negativo), el gen objetivo del cálculo se selecciona como gen marcador de ineficacia. De acuerdo con la fórmula del cálculo descrito anteriormente, el gen diana se puede juzgar como un gen que indica eficacia considerable cuando el valor resultante es positivo, mientras que el gen diana se puede juzgar como un gen que indica ineficacia cuando el valor resultante es negativo.

Por ejemplo, cuando los índices de eficacia considerable se calculan con respecto al gen GEMIN4 mencionado anteriormente en las condiciones descritas anteriormente, los índices de eficacia considerable serán los siguientes:

Fórmula (1); $(0/12 - 8/9) \times 100 = -88,9$

Fórmula (2); $(12/12 - 1/9) \times 100 = 88,9$

En el presente documento, la $VNC = 2 (VNC = N)$ se considera básica, cuando se restó una porción del número de personas correspondiente al 80% de la población parental (por ejemplo, $24 (VNC=1) \times 0,8 = 19$ personas) . Dado que la resta de 19 personas dio un número negativo, se consideró 0.

Después, si el valor absoluto del criterio objetivo de la selección se fija en 50, se juzga que el gen indica eficacia considerable cuando el índice es +50 o superior y se juzga que el gen indica ineficacia cuando el índice es -50. EN el caso del ejemplo descrito anteriormente, el criterio de selección del índice de eficacia considerable se fijó en 50 (valor absoluto) pero se puede fijar en 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 de acuerdo con la presente invención en función de la finalidad del análisis.

De acuerdo con lo anterior, ya que el valor obtenido en la fórmula (1) es un valor negativo, el gen GEMIN4 con una VNC de 1 se selecciona como un gen que indica que la inmunoterapia con alérgenos es ineficaz, mientras que el gen GEMIN4 con una VNC de 3 se selecciona como un gen que indica que la inmunoterapia con alérgenos es considerablemente eficaz.

Adicionalmente eficaz, de acuerdo con la presente invención, para seleccionar un gen para juzgar entre eficacia considerable y eficacia, se pueden usar varias técnicas de análisis estadístico, tales como análisis multivariado. Ejemplos de un análisis multivariado incluyen un análisis de regresión múltiple, un análisis discriminador, un análisis de componente principal, un análisis de factores y similares. Véanse los detalles en el Ejemplo 2 descrito más adelante.

Por otro lado, de acuerdo con el método de la presente invención, los resultados de la medición de la VNC del gen descrito anteriormente obtenido de un número predeterminado de pacientes (población parental primaria) se puede usar como datos de referencia de modo que la eficacia de la inmunoterapia con alérgenos se pueda juzgar para un sujeto fuera de la población parental primaria comparando la VCN de cada gen del sujeto con los datos de referencia.

Los datos del sujeto fuera de la población parental primaria también se pueden integrar en los valores de la población parental primaria y el nivel de expresión del mismo puede someterse de nuevo a procesamiento de datos (promediado etc.), para aumentar el número de sujetos diana (la población parental). Aumentando el número de casos se puede mejorar la precisión de la VNC de cada gen y, por tanto, la exactitud de la detección o el diagnóstico.

En un contexto clínico real, el método de la presente invención se puede aplicar a muestras obtenidas individualmente de pacientes, sujetos que han sido sometidos a un examen médico o similar, para juzgar si la inmunoterapia con alérgenos es considerablemente eficaz o ineficaz para los pacientes o los sujetos antes de iniciar el tratamiento real. Específicamente, el ADN genómico se obtiene de la muestra para detectar el número de copias del gen asociadas a eficacia considerable o ineficacia de la inmunoterapia con alérgenos. Cuando el número de copias es L o G, se puede juzgar que el paciente o el sujeto muestran una eficacia considerable o ineficacia de la inmunoterapia con alérgenos.

Por ejemplo, en el caso en el que la VNC del gen NAV3 presente en el ADN genómico obtenido de un paciente determinado es L, cabe esperar que este paciente muestre una eficacia considerable a la inmunoterapia con alérgenos.

Además, los números de copias se examinaron para determinar el número M de genes entre los genes NAV3, TYRP1, NCAM2, PCDH17, CHODL, BTG3, DIAPH3, GBA3, IFRD1, KCNT2, THOC7, TMEM168, BST1, C7orf53, CD38, DCUN1D1, FGFBP1, FXP2, GLRB, GTF2B, HSP90AB2P, MCCC1, MDFIC, ODF2L, PDGFC, SEP15, SH3GLB1, TDRD3 y YEATS2 en un genoma obtenido de un paciente determinado. Si el número de copias es L para algunos de los genes analizados pero N o G para el resto de los genes, los números de copia de L, N y G se puntúan como +1, 0 and -1, respectivamente, y las puntuaciones se suman para cada gen. De la suma resultante se puede realizar exhaustivamente un juicio de eficacia considerable o ineficacia. En este caso, cuando la suma es del 50% o más, preferentemente 60% o más, 70% o más, 80% o más, 90% o más o 100% con respecto a M, se puede juzgar que el paciente muestra eficacia considerable a la inmunoterapia con alérgenos.

Como alternativa, la suma de las puntuaciones asignada a los números de copia de un determinado gen o una pluralidad de genes se puede presentar al paciente al tiempo que se explica la correlación entre el número de copias o la suma con eficacia considerable o ineficacia de la inmunoterapia con alérgenos, por lo que se puede usar como un factor de riesgo para que el propio paciente juzgue si realmente realizar o continuar con la inmunoterapia con alérgenos con el número de copias o la suma en mente.

Adicionalmente, se puede usar el resultado de la detección, por ejemplo como información principal o información auxiliar para establecer un diagnóstico de confirmación de la eficacia terapéutica contra una alergia inmediata. Con el fin de realizar un diagnóstico para confirmar que se ha tratado la alergia inmediata se puede realizar un juicio exhaustivo combinando los resultados de detección descritos anteriormente con al menos uno seleccionado de los resultados de exploraciones físicas, los resultados de un análisis sexológico y similares después de la inmunoterapia

con alérgenos.

5. Micromatriz y kit

Adicionalmente, un extremo de los oligonucleótidos de la presente invención e puede fijar a un soporte, tal como un vidrio, sílice o gel para preparar una micromatriz. La matriz de oligonucleótidos se puede producir mediante, por ejemplo, el método de síntesis química con irradiación lumínica (Affymetrix) en la que un método de síntesis química de fase sólida se combina con una técnica de producción de fotolitografía empleada en la industria de semiconductores. Con el fin de definir claramente el límite entre los sitios de reacción química sobre el circuito se lleva a cabo un proceso de síntesis química concreto usando una máscara de fotolitografía, de modo que se construye una matriz de alta densidad que tiene sondas oligonucleotídicas unidas a posiciones predeterminadas de la matriz.

Adicionalmente, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un kit para detectar variaciones VNC de un gen, que incluye oligonucleótidos de la presente invención y/o una micromatriz preparada con los oligonucleótidos. Dicho kit puede también incluir, aparte de los oligonucleótidos de la presente invención y/o la micromatriz preparada con los oligonucleótidos, una solución para la reacción de detección, un oligonucleótido como control, un vaso usado para la reacción de detección, instrucciones y similares.

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá más específicamente por medio de ejemplos, aunque estos ejemplos se proporcionan para el fin de ilustrar la presente invención y no limitar la presente invención.

Ejemplo 1

<Método>

1. Clasificación entre grupo terapéuticamente eficaz y grupo ineficaz

En primer lugar, la eficacia terapéutica de la inmunoterapia con alérgenos sublingual para la alergia al polen de cedro se analizó durante dos años de administración de un fármaco terapéutico para la alergia al polen (un fármaco de inmunoterapia con alérgenos). El fármaco de inmunoterapia con alérgenos (extracto de polen de cedro estandarizado (Torii Pharmaceutical Co., Ltd.)) se administró según el programa de administración mostrado en la Tabla 2.

[Tabla 2]

	Semana 1 2 JAU/ml	Semana 2 20 JAU/ml	Semana 3 200 JAU/ml	Semana 4 2000 JAU/ml	Semana 5 y posteriores 2000 JAU/ml
Día 1	Gota	Gota	Gota	Gota	
Día 2	2 gotas	2 gotas	2 gotas	2 gotas	
Día 3	3 gotas	gotas	3 gotas	4 gotas	20 gotas
Día 4	4 gotas	4 gotas	4 gotas	8 gotas	
Día 5	6 gotas	6 gotas	6 gotas	12 gotas	
Día 6	8 gotas	8 gotas	8 gotas	18 gotas	
Día 7	10 gotas	10 gotas	10 gotas	20 gotas	20 gotas

Los pacientes se clasificaron en un grupo con eficacia terapéutica considerable (grupo considerablemente eficaz) y un grupo sin eficacia terapéutica (grupo en el cual las condiciones habían empeorado o no habían cambiado con el tratamiento: grupo terapéuticamente ineficaz) con respecto a los síntomas de alergia. Al hacerlo, las condiciones previas al tratamiento en agosto, *Heisei* 18 (2006), las condiciones en el medio del tratamiento en abril, *Heisei* 19

(2007) y las condiciones en el periodo posterior del tratamiento en abril *Heisei* 20 (2008) se clasificaron en el grupo eficaz y el grupo ineficaz del tratamiento de la alergia al polen usando, como indicadores, las condiciones clínicas obtenidas mediante puntuación exhaustiva de las condiciones de la membrana mucosa de la nariz el día de la alergia.

2. Obtención de suero

Durante el periodo de la inmunoterapia con alérgenos sublingual se extrajo sangre 8 veces según el programa mostrado en la Figura 1 (extracciones de sangre 1 a 8). La cantidad de sangre por una sola extracción de sangre fue de 8 ml por persona, que se sometió a operación centrífuga inmediatamente después de la extracción de sangre para aislar el suero. Se dispensó 1 ml de cada suero aislado y se almacenó a -80°C hasta su uso.

3. Obtención de ADN y ARN

Se obtuvieron muestras de ARN antes y después de la inmunoterapia con alérgenos sublingual, por separado del suero descrito anteriormente, tras la extracción de sangre 1 (antes del tratamiento) y la extracción de sangre 7 (tras el tratamiento) mostradas en la Figura 1.

La inmunoterapia con alérgenos sublingual se llevó a cabo administrando fármacos reales a 202 pacientes durante dos años desde agosto, *Heisei* 18 (2006). La terapia se llevó a cabo en ocho hospitales en Japón. Las muestras de sangre se obtuvieron según el programa de extracciones de sangre 1 a 8 mostradas en la Figura 1 y las muestras de ADN se extrajeron tras la extracción de sangre 2 mostrada en la Figura 1.

La cantidad de sangre extraída por única extracción de sangre fue de 8 ml por persona, que se sometió a aislamiento celular inmediatamente después de la extracción de sangre con citometría de flujo (Becton, FACSaria) para aislar en linfocitos T CD4, una célula dendrítica y similares. Las células aisladas se suspendieron cada una en un medio de conservación por congelación celular y después se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Junto con el juicio de la eficacia terapéutica en junio, *Heisei* 20 (2008), se ordenaron 25 pacientes de cada una de las muestras terapéuticamente eficaz e ineficaz que se habían clasificado y sus ARN se purificaron de acuerdo con una técnica habitual. El ARN mensajero purificado (ARNm) se sometió inmediatamente a un analizador de genes (circuito de ADN de Affymetrix).

Mientras tanto se obtuvo el ADN durante el periodo de análisis como se ha descrito anteriormente para el cual la cantidad de sangre extraída fue de 8 ml por persona. Se realizaron operaciones de centrifugación inmediatamente después de extraer la sangre con el fin de aislar las células sanguíneas. Se obtuvo el ADN de las células sanguíneas resultantes de acuerdo con una técnica habitual. El ADN purificado y aislado se almacenó a -80°C hasta el análisis génico.

4. Ensayo serológico

Para los sueros obtenidos anteriormente se midieron los niveles de IgE específicos del polen de de cedro (RISA-cedro) y los niveles de IgE total (RAST) mediante ELISA de acuerdo con una técnica habitual. Cincuenta tipos de factores humorales relacionados con el sistema inmunológico en la sangre (Tabla 3) se midieron de acuerdo con un método de medición con esferas fluorescentes (Bio-plex de Bio-Rad).

[Tabla 3]

Términos de medición para factores humorales relacionados con el sistema inmunológico												
Grupo I humano	Panel 27-Plex (171-A11127)											
Grupo de citocinas	IL-1 β	1L-1R α	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-9				
	IL-10	IL-12	IL-13	IL-15	IL-17	IFN- γ	TNF- α					
Grupo de quimiocinas	IL-8	Eotaxina	IP-10	MCP-1(MCAF)	MIP-1 α	MIP-1 β	RANTES					
Grupo de factores de crecimiento	FGF básico	G-CSF	GM-CSF	PDGF-BB	VEGF							
	Grupo II humano Panel de 23-Plex (171-A11123)											
Grupo de citocinas	IL-1 α	IL-2R α	IL-3	IL-12 (p40)	IL-16	IL-18	IFN- α 2	TNF- β	TRAIL			
Grupo de quimiocinas	CTACK	GRO- α	ICAM-1	MCP-3	MIF	MIG	VCAM-1					
Grupo de factores de crecimiento	HGF	LIF	M-CSF	β -NGF	SCF	SCGF- β	SDF1 α					

5. Análisis integrado

Se realizó el estudio clínico mediante administración del fármaco real en una escala de aproximadamente 200 pacientes. La duración del tratamiento fue de aproximadamente dos años y los datos, como las condiciones clínicas, se obtuvieron para aproximadamente 150 pacientes al final. Las condiciones (niveles de gravedad) se puntuaron para clasificar la eficacia terapéutica con detalle. Como resultado, la clasificación dio cinco grupos, entre los cuales se extrajeron el grupo con la eficacia terapéutica más alta (grupo de tratamiento considerablemente eficaz) y el peor grupo (grupo terapéuticamente ineficaz). Los biomateriales de los primeros 24 pacientes y los últimos 25 pacientes de estos grupos se sometieron al siguiente análisis de investigación.

A continuación en el presente documento se describirán los detalles.

Se realizó inmunoterapia con alérgenos sublingual desde el principio del tratamiento durante dos años y 154 pacientes entrevistados sobre sus condiciones clínicas en junio, 2008 (*Heisei* 20) se sometieron a análisis. Además de la evaluación previa de las condiciones se añadieron datos de QOL y similares para su posterior investigación y se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 2.

En la Figura 2, como se muestra en el gráfico de la parte superior izquierda, el nivel medio de gravedad de la condición muestra que las condiciones se habían aliviado año a año en comparación con el resultado de la exploración previa al estudio y que el tratamiento había tenido éxito. Se extrajeron 38 personas del grupo de tratamiento considerablemente eficaz. Por otro lado, el gráfico inferior no muestra ningún cambio o un incremento del nivel promedio de la gravedad de los síntomas de alergia cada año con respecto a la exploración previa al estudio. Esto indica un grupo de pacientes para los que dos años de inmunoterapia con alérgenos sublingual no fueron eficaces. Se extrajeron 37 personas de este grupo terapéuticamente ineficaz. Adicionalmente, los pacientes extraídos de cada grupo se disponen verticalmente en orden comenzando con el paciente con la peor eficacia terapéutica con respecto al percentil mostrado por los colores en los paneles de la derecha en la Figura 2.

Las condiciones (condiciones graves) con el nivel de gravedad más alta de 5 se muestran en rojo, mientras que las condiciones más bajas (condiciones leves) de 1 se muestran en verde. Las condiciones que están entre los niveles de gravedad más alta y más baja se muestran en un sombreado de gradientes de rojo a verde. Los pacientes extraídos por eficacia terapéutica se disponen verticalmente en orden comenzando desde la eficacia más alta para el grupo considerablemente eficaz y desde la eficacia más baja para el grupo terapéuticamente ineficaz. Los primeros 24 y 25 pacientes del grupo considerablemente eficaz y el grupo terapéuticamente ineficaz, respectivamente, se sometieron al siguiente análisis.

<Términos del análisis y método de análisis integrado>

(1) Análisis de las condiciones clínicas

Los niveles de gravedad al principio de la inmunoterapia con alérgenos (a partir de 2006) se organizaron en 5 etapas desde 1 (leve) a 5 (grave) para usar como indicadores de gravedad. Como indicadores del alivio tras el juicio de eficacia tras dos años de inmunoterapia con alérgenos (a partir de 2008), la eliminación e los síntomas o mejores del nivel de gravedad en dos etapas se definió como de grado 1 (grupo de tratamiento considerablemente eficaz), mejora del nivel de gravedad en una etapa como grado 2 y sin cambios o empeoramiento como grado 3 (grupo de tratamiento terapéuticamente ineficaz).

(2) Análisis serológico

Además de los 50 factores humorales descritos anteriormente (Tabla 3), se añadieron los niveles de IgE específicos de antígeno y los niveles de IgE totales.

(3) Análisis del ARNm

El ARNm derivado de los linfocitos T cd4+ fraccionados mediante FACS de las muestras de sangre extraídas a los puntos de extracción de sangre 1 y 7, es decir tras la evaluación de la gravedad o alivio se usó para la detección con la matriz GeneChip (R) Human Gene 1,9 ST de Affymetrix. Como proceso previo, se llevó a cabo normalización del nivel de expresión de ARNm usando el algoritmo de ARN (1) con paquete aroma.affymetrix [programa R] para obtener un valor de ARNm del gen corregido.

(4) Análisis de la VNC

Se usó el kit de micromatriz Agilent Sure Print 3G CNV para detectar un total de 49 pacientes de los grupos de pacientes (24 del grupo de tratamiento considerablemente eficaz y 25 del grupo terapéuticamente ineficaz) para detectar los números de copias VNC de acuerdo con el método siguiente.

Para el ADN genómico extraído de muestras de sangre derivada de sangre periférica, el valor Log2 resultante de la hibridación competitiva con la muestra japonesa HapMap NA19000 de ADN de referencia como proceso previo se normalizó con Normtools (2) en base a los datos de la población. Los valores de Log2 corregidos se usaron como aberración del número de copias (ANC) para el juicio de segmentos mediante el algoritmo CBS [programa R], obteniendo de este modo datos de VNC. En base a estos datos de VNC, el número de copias VNC se juzgó mediante unidades génicas usando [mediana de la población $\pm$ 2SD mediana *de la población individual] del valor de los datos de VNC como umbral (número de copias = 2).

(5) Modelos de análisis y análisis integrado

- 1) Gravedad de la alergia al polen en 2006, VNC ARNm (punto 1 de extracción de sangre antes del tratamiento)
- 2) Evaluación de la eficacia (alivio) en 2008, VNC: ARNm (punto 7 de extracción de sangre después del tratamiento)

Se analizaron en el modelo de análisis 1) las relaciones con la gravedad reflejando las condiciones de la alergia al polen en un individuo antes del comienzo del estudio clínico en 2006, mientras que en el modelo de análisis 2) se analizó la relación con el alivio reflejando el juicio de la eficacia de la inmunoterapia con alérgenos mediante el estudio clínico en 2008.

Para los 18.945 genes entrelazados con los símbolos génicos basados en datos de ARNm y datos de VNC, se realizó un modelo de análisis de regresión lineal usando tres parámetros, es decir términos de ensayo serológico, valores de ARNm y valores de VNC de los modelos de análisis mencionados anteriormente 1) y 2) como variables explicativas y el nivel de gravedad de la alergia al polen en la primavera de 2006 y el valor del juicio de eficacia del ensayo con extracto de polen de cedro en la primavera de 2008 como variables dependientes.

Los valores P y los niveles de contribución (valores R2 corregidos) se calcularon para aproximadamente 3,63 millones de análisis como los modelos de análisis 1) y 2). La clasificación se realizó para los modelos de análisis 1) y 2) filtrando usando los niveles de contribución de los modelos de análisis con la línea de regresión como criterio. Después, la relación con el valor p se evaluó como el valor P corregido de Bonferroni. Los modelos de análisis resultantes y cada variable explicativa se examinaron con detalle en términos de la asociación entre el valor del marcador sérico clínico, el valor del ARNm o el valor de la VCN y el fenotipo clínico, de modo que se obtienen modelos candidatos finales.

Específicamente, con respecto a cada grado del modelo de análisis 1) (etapas 1 a 5) y el modelo de análisis 2) (etapas 1 a 3), se usó el programa R-2.9 para calcular el valor R2 como el nivel de contribución y el valor P para una combinación en la cual un término cualquiera se modifica en proporción a la medida de otro término en asociación no aditiva, como término de interacción de tres términos de parámetros, es decir (a) fuerza de Log2 del gen del ARNm, (b) proporción Log2 relativa del segmento de VNC en el gen y (c) términos del ensayo serológico determinados antes y después de los puntos de obtención de ARNm/extracción de sangre. En el presente documento, en cuanto al término del ensayo serológico, los valores de las extracciones de sangre 1 y 2 y las extracciones de sangre 5 y 6 se hicieron corresponder con los modelos de análisis 1) y 2), respectivamente. Después del cálculo de los valores estadísticos, la filtración de primera etapa se realizó en cada modelo de análisis para extraer combinaciones como combinaciones candidatas de $R^2 > 0,2$ y el valor $P < 0,05$. Como resultado se obtuvieron 79 y 396 combinaciones para los modelos de análisis 1) y 2), respectivamente. Entre estas combinaciones, se obtuvieron combinaciones mediante filtración de segunda etapa en la que los resultados del juicio de número de copias obtenido en (4) análisis de la VNC anterior se evaluaron de nuevo con respecto al número de copias VNC del gen.

Como resultado se obtuvieron 20 y 227 combinaciones en los modelos de análisis 1) y 2) respectivamente, mientras que se obtuvieron 12 y 86 genes en los modelos de análisis 1) y 2) respectivamente. Entre estos genes, el análisis de regresión lineal general se realizó usando el modelo de análisis 2) y el término de ensayo serológico como la filtración de tercera etapa para extraer el término del ensayo serológico significativo (valor $p < 0,05$) a partir de este modelo de análisis. Como resultado se obtuvieron 22 genes con 37 combinaciones.

<Análisis de la VNC y resultados del análisis integrado>

De los análisis descritos anteriormente se obtuvieron 12 genes (Tabla 4) para el modelo de análisis 1) hasta la filtración de segunda etapa, mientras que se obtuvieron 22 genes para el modelo de análisis 2) hasta la filtración de tercera etapa (Tabla 5), lo que tiene como resultado un total de 34 genes de los modelos de análisis 1) y 2) (Tabla 6).

[Tabla 4]

Gen	Nombre del gen	Marcador sérico	Cromosoma	Banda cromosómica	N	Valor p	R_cuad
C12orf60	Marco de lectura abierto 60 del cromosoma 12	IL1B_1 MIP.1B_1	12	12p12,3	42	0,000943851	0,213265988
SRP14	Partícula de reconocimiento de señal de 14 kDa (proteína de unión al ARN de Alu homóloga)	MCP.3_1	15	15q22	41	0,001224931	0,204076074
C16orf48	Marco de lectura abierto 48 del cromosoma 16	_CTACK_1_ MIF_1	16	16q22,1	41	0,001187278	0,209682617
SMPD3	Esfingomielina fosfodiesterasa 3, neutra	IL.12p40_1	16	16q22,1	41	0,001408257	0,203513736
	Membrana (esfingomielinasa neutra, II)	RAST_1			48	0,000838055	0,222160983
TMED6	Dominio de transporte de la proteína emp24 transmembrana que contiene 6	IL.12p40_1	16	16q22,1	41	0,001433575	0,202867716
NOB1	Homólogo 1 de la proteína de unión NIN1/RPN12 (S_cerevisiae)	CTACK_1	16	16q22,3	41	0,000420248	0,214315316
GEMIN4	Proteína 4 asociada a gcm (orgánulo nuclear)	PDGF.BB_2	17	17p13	48	0,001330579	0,205568236
SDF2L1	Factor 2 de tipo 1 derivado de células estromales	PDGF.BB_2	22	22q11,21	48	0,001358123	0,204826754
		SCF_1			41	0,000622967	0,202088296
CAV3	Caveolina 3	MIP.1A_1 MIP.1B_1	3	3p25	42	0,00061778	0,202349482
DNAJB8	Homólogo de DnaJ_ (Hsp40), subfamilia B, miembro 8	TNF.B_1	3	3q21,3	41	0,001539543	0,200273444
		TNF.B_2			48	0,001275146	0,202652638
AZGP1	Alfa-2-glicoproteína 1, unión a cinc	PDGF.BB 2	7	7q22,1	48	0,000969229	0,212334198
GJC3	Proteína de unión a gap, gamma, 3_30,2kDa	PDGF.BB_2 IgE_2	7	7q22,1	48	0,0009576	0,217401842
Corrección de Bonferroni 3,36E-6 [P=0,05] *No se hallaron diferencias significativas con corrección							

Entre los modelos de análisis 1), por ejemplo se descubrió que el número de copias VNC del gen GJC3 mostraba una fuerte correlación con la condición clínica. En particular, todos los casos con el número de copias (NC) de 3 (barra "G" en la Figura 3) entraron dentro del grupo de tratamiento considerablemente eficaz, lo que tiene como resultado un 30% de la totalidad del grupo de tratamiento considerablemente eficaz (Figura 3).

[Tabla 5]

Gen	Nombre del gen	Marcador sérico	Cromosoma	Banda cromosómica	N	Valor p	Valor R2
SNORA44	ARN nuclear pequeño, caja H/ACA 44	SCGF.B_5	1	1p35,3	47	2,06E-06	0,37090163
PAFAH2	Factor activador de las plaquetas acetilhidrolasa 2, 40kDa	IL.16_5	1	1p36	47	2,52E-06	0,365632168
		IL.16_6				1,66E-06	0,376437646
MARK2	Quinasa 2 reguladora de la afinidad de MAP/microtúbulos	SDF.1A_6	11	11q12-q13	47	3,24E-06	0,358983529
FTH1	Ferritina, polipéptido pesado 1	CTACK_6	11	11q13	47	1,29E-06	0,382945153
PPFIA1	Proteína tirosina fosfatasa, de tipo receptor, polipéptido f (PTPRF), proteína de interacción (liprina) alfa 1	IL.17_5	11	11q13,3	48	8,83E-07	0,386101007
SCARNA11	ARN específico de cuerpos de Cajal pequeño 11	SCGF.B_5	12	12p13,31	47	1,94E-06	0,372476068
NAV3	Navegador neuronal 3	SCGF.B_5	12	12q14,3	47	2,00E-06	0,371668677
CUL4A	Culina 4A	IL.17_5	13	13q34	48	2,19E-06	0,36312568
METHOD	Dominio de metiltransferasa 10 que contiene	SDF.1A_5	17	17p13,3	47	2,16E-06	0,36962831
ST6GALNAC1	ST6_(alfa-N-acetil-neuraminil-2,3-beta-galactosil-1,3)-N-acetilgalactosaminida_alfa-2,6-sialiltransferasa_1	GROA_5	17	17q25,1	47	3,23E-06	0,359052891
C19orf34	Marco de lectura abierto 34 del cromosoma 19	SDF.1A_5	19	19p13,3	47	2,40E-06	0,366880952
GIGYF2	proteína 2 GYF de interacción con GRB10	IL.17_5	19	19p13,3	48	1,83E-06	0,367710153
		LIF_5	2	2q37,1	47	3,05E-06	0,360613413
		IL.17_5			48	8,89E-07	0,385926013
CXCR7	Receptor 7 de quimiocina (motivo C-X-C)	IL.17_5	2	2q37,3	48	1,75E-07	0,4251419
ITCH	Homólogo de la proteína ligasa ubiquitina E3 itchy (ratón)	IL.17_5	20	20q11,22-q11,23	48	2,15E-06	0,363600569
SULF2	sulfatasa -2	IL.16_6	20	20q12-q13,2	47	2,33E-06	0,367680122
		SDF.1A_5				2,93E-06	0,361613012
		IL.17_5			48	1,84E-06	0,367566094
WFDC13	Dominio del núcleo de cuatro disulfuros WAP 13	IL.17_5	20	20q13,12	48	1,95E-06	0,366163387
ZNFX1	Dedo de cinc, de tipo NFX1, que contienen 1	IL.17_5	20	20q13,13	48	1,77E-06	0,36858352
HTT	huntingtina	IL.17_5	4	4p16,3	48	6,51E-07	0,393643249
CEP72	Proteína del centrosoma 72 kDa	SDF.1A_6	5	5p15,33	49	2,59E-06	0,352920145
PLEKHG4B	Miembro 4B de la familia G (con dominio RhoGof) que contiene el dominio de homología con pleckstrina	SCGF.B_5	5	5p15,33		1,21E-06	0,378300339
		SDF.1A_5			48	1,78E-06	0,368385058
		SDF.1A_6_				1,27E-06	0,377084356

Gen	Nombre del gen	Marcador sérico	Cromosoma	Banda cromosómica	N	Valor p	Valor R2
		IL.17_5			49	2,87E-07	0,406974024
		LIF_6				2,71E-06	0,363654888
		SDF.1A_5			47	1,69E-06	0,375949058
		SDF.1A_6				3,05E-06	0,360612552
		IL.17_5				2,26E-06	0,362326452
		IL.17_6				3,14E-06	0,353765562
		SDF.1A_5			47	2,97E-06	0,361292878
		IL.4_5				2,65E-06	0,358242222
		IL.4_6			48	1,68E-06	0,369931555
		IFN.G_6				3,09E-06	0,354170759
		Corrección de Bonferroni 3,36E-6 [P=0,05]					
AGXT2L2	Alanina glioxilato aminotransferasa 2 de tipo 2		5	5q35,3			
TYRP1	Proteína 1 relacionada con la tirosinasa		9	9p23			

Además, entre los modelos de análisis 2), por ejemplo se descubrió que el número de copias VNC del MÉTODO y los genes CXCR7 mostraban una fuerte correlación con las condiciones clínicas. En particular, todos los casos con el número de copias de 3 (barras "G" en las Figuras 4 y 5) entraron dentro del grupo de tratamiento considerablemente eficaz, lo que tiene como resultado un 50 % de la totalidad del grupo de tratamiento considerablemente eficaz (Figuras 4 y 5).

5

[Tabla 6-1]

Gen	Nombre del gen
C12orf60	Marco de lectura abierto 60 del cromosoma 12
SRP14	Partícula de reconocimiento de señal de 14 kDa (proteína de unión al ARN de Alu homóloga)
C16orf48	Marco de lectura abierto 48 del cromosoma 16
SMPD3	Esfingomielina fosfodiesterasa 3, membrana neutra (esfingomielina neutra II)
TMED6	Dominio de transporte de la proteína emp24 transmembrana que contiene 6
NOB1	Homóloga 1 de la proteína de unión NIN1/RPN12 (S. cerevisiae)
GEMIN4	Proteína 4 asociada a gcm (orgánulo nuclear)
SDF2L1	Factor 2 de tipo 1 derivado de células estromales
CAV3	Caveolina 3
DNAJB8	Homólogo de DnaJ_(Hsp40), subfamilia B, miembro 8
AZGP1	Alfa-2-glicoproteína 1, unión a cinc
GJC3	Proteína de unión a gap, gamma 3, 30,2 kDa
SNORA44	ARN nuclear pequeño, caja H/ACA 44
PAFAH2	Acetilhidrolasa 2 del factor de activación de las plaquetas, 40 kDa
MARK2	Quinasa 2 reguladora de la afinidad de MAP/microtúbulos
FTH1	Ferritina, polipéptido pesado 1
PPFIA1	Proteína tirosina fosfatasa, de tipo receptor, polipéptido f (PTPRF), proteína de interacción (liprina), alfa 1
SCARNA11	ARN específico de cuerpos de Cajal pequeño 11
NAV3	Navegador neuronal 3
CUL4A	Culina 4A
METT10D	Dominio 10 de metiltransferasa que contiene
ST6GALNAC1	ST6_(alfa-N-acetil-neuraminil-2,3-beta-galactosil-1,3)-N-acetilgalactosaminida_alfa-2,6-sialiltransferasa_1
C19orf34	Marco de lectura abierto 34 del cromosoma 19
GIGYF2	Proteína GYF de interacción con GRB10 2
CXCR7	Receptor 7 de quimiocina (motivo C-X-C)
ITCH	Homólogo de la proteína ligasa ubiquitina E3 itchy (ratón)
SULF2	Sulfatasa 2
WFDC13	Dominio del núcleo de cuatro disulfuros VAP 13

[Tabla 6-2]

ZNFX1	Dedo de cinc, de tipo NFX1 que contiene 1
HTT	huntingtina
CEP72	Proteína del centrosoma 72 kDa
PLEKHG4B	Miembro 4B de la familia G (con dominio RhoGof) que contiene el dominio de homología con pleckstrina
AGXT2L2	Alanina glioxilato aminotransferasa 2 de tipo 2
TYRP1	Proteína 1 relacionada con la tirosinasa

10

Adicionalmente, para cada gen, teniendo en cuenta los números de copia VNC de pacientes cuyos tratamientos eran considerablemente eficaces (24 casos) o ineficaces (25 casos), el número de pacientes con un número de copias VNC de 1 para el gen se comparó con el número de pacientes con un número de copias VNC de 3. Después, el

número de copias VNC para el gen que aparece con más frecuencia en el grupo considerablemente eficaz se puntuó en +1 mientras que el número de copias VNC que aparece con más frecuencia en el grupo ineficaz se puntuó en -1. Adicionalmente, cuando la diferencia entre el número de pacientes con un número de copias VNC de 1 y el número de pacientes con un número de copias VNC de 3 para el gen es igual o inferior a 2, se puntuó en 0.

Los resultados obtenidos aplicando esta puntuación a cada paciente se muestran en la Tabla 7. Las puntuaciones para cada paciente se sumaron y la distribución y la puntuación sumada para cada paciente se muestran en la Tabla 8.

[Tabla 7]

		C12orf60	SRP14	C16orf48	SMPD3	TMED6	NOB1	GEMIN4	SDF2L1	CAV3	DNAJB8	A2GP1
Julcio	CNV=1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	
	CNV=3	-1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
Grupo	Nº	C12orf60	SRP14	C16orf48	SMPD3	TMED6	NOB1	GEMIN4	SDF2L1	CAV3	DNAJB8	A2GP1
Grupo considerablemente eficaz	1							1				
	2							1	1			
	3							1	1			
	4											
	5										-1	
	6											
	7											
	8							1				
	9											
	10							1				1
	11							1	1			1
	12											
	13							1			1	1
	14			0	0	0	0	1	1			
	15							1			1	1
	16	0						1			1	1
	17							1			1	
	18							1			1	
	19											
	20								1			
	21	0										
	22											
	23											
	24										1	
Grupo ineficaz	25											
	26											
	27											
	28											
	29											
	30							1				
	31	-1						-1		-1	-1	
	32							-1			-1	
	33											
	34											
	35	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	
	36											
	37			-1	-1	-1	-1					
	38											
	39											
	40	-1						-1		1		-1
	41	-1		-1	-1	-1	-1	-1		-1		
	42											
	43											
	44											
	45			0	0	0	0	-1		1		
	46											
	47	-1	0					-1				
	48	0	-1					-1	0			-1
	49											

[illegible]

GIGYF2	OXCR7	ITCH	SULF2	WFDC13	ZNFX1	HTT	CEP72	PLEKHG4B	AGXT2L2	TYRP1	
-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	
1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	-1	
GIGYF2	OXCR7	ITCH	SULF2	WFDC13	ZNFX1	HTT	CEP72	PLEKHG4B	AGXT2L2	TYRP1	SUM
											7
	1						1	1			20
	1	1					1	1			13
											1
			0		-1	-1	-1	-1			-9
						-1					-1
											0
						1	1	1			9
											-1
	1	-1					1	1			17
	1		0	1	1	1	1	1	1		22
											0
	1	1					1	1	1	1	19
	1	1					1	1	1	1	21
	1	1					1	1	1	1	19
	1	1					1	1	1	1	17
	1	1					1	1	1	1	18
	1	1					1	1	1	1	17
	1	1		1	1	1	1	1	1	1	11
	1	1					1	1	1	1	10
							1	1	1	1	9
							1	1	1	1	2
	1	1	0	1	1	1	-1	-1	-1		-3
	1	1									17
											0
						1	1	1		1	7
											0
											0
	-1		-1			-1	-1		-1	-1	-16
	-1	-1				-1	-1	-1			-11
	-1					-1	-1	-1			-6
	-1	-1		0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0
	-1	-1	-1			-1	-1	-1	-1	-1	-30
						-1					0
											-8
											0
	-1	-1	-1			-1	-1	-1		-1	-5
	-1	-1				-1	-1	-1	-1		-20
	-1	-1				-1	-1	-1	-1		-25
	-1					-1	-1	-1	-1	-1	-11
											-1
			-1	0	-1	-1	-1	-1			-13
						-1	-1	-1			-6
						-1	-1	-1	-1		-17
		-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1		-22
											-4

[Tabla 8]

Puntuación	Recuento (personas)		(cont.)		
	Considerablemente eficaz	Ineficaz			
33	0	0	-1	2	2
32	0	0	-2	0	0
31	0	0	-3	1	0
30	0	0	-4	0	1
29	0	0	-5	0	1
28	0	0	-6	0	2
27	0	0	-7	0	0
26	0	0	-8	0	0
25	0	0	-9	1	1
24	0	0	-10	0	0
23	0	0	-11	0	2
22	1	0	-12	0	0
21	1	0	-13	0	1
20	1	0	-14	0	0
19	3	0	-15	0	0
18	0	0	-16	0	1
17	4	0	-17	0	1
16	0	0	-18	0	0
15	0	0	-19	0	0
14	0	0	-20	0	1
13	1	0	-21	0	0
12	0	0	-22	0	1
11	1	0	-23	0	0
10	1	0	-24	0	0
9	2	0	-25	0	1
8	0	0	-26	0	0
7	1	1	-27	0	0
6	0	0	-28	0	0
5	0	0	-29	0	0
4	0	0	-30	0	1
3	0	0	-31	0	0
2	1	1	-32	0	0
1	1	0	-33	0	0
0	2	7	Total	24	25

	~ 1	0	1~	Total (personas)
Considerablemente eficaz	4	2	18	24
Ineficaz	16	7	2	25

Los genes diana que se van a seleccionar se definieron como genes que tienen una diferencia en la cifra de personas entre el grupo considerablemente eficaz y el grupo ineficaz de 2 o más para una VNC de 1 o 3 de acuerdo con los criterios siguientes.

5

- (a) Considerablemente eficaz cuando la VNC es 1
- (b) Considerablemente eficaz cuando la VNC es 3
- (c) Ineficaz cuando la VNC es 1
- (d) Ineficaz cuando la VNC es 3

10

Los genes que entran dentro de los criterios descritos anteriormente se muestran en la Tabla 9. En la Tabla 9, los círculos están marcados a la derecha para los genes que entran dentro de los criterios descritos anteriormente.

[Tabla 9]

(CE): Considerablemente eficaz (IE): Ineficaz										(a) VNC 1 (CE)	(b) VNC 3 (CE)	(c) VNC 1 (IE)	(d) VNC 3 (IE)
1 (CE)	1 (IE)	1 (CE)-1 (IE)	Nombre del gen	3 (CE)	3 (IE)	3 (CE)-3 (IE)	Nombre del gen						
2	1	1	C12orf60	0	5	-5	C12orf60						O
0	2	-2	SRP14	0	1	-1	SRP14					O	
0	3	-3	C16orf48	1	1	0	C16orf48					O	
0	3	-3	SMPD3	1	1	0	SMPD3					O	
0	3	-3	TMED6	1	1	0	TMED6					O	
0	3	-3	NOB1	1	1	0	NOB1					O	
0	8	-8	GEMIN4	12	1	11	GEMIN4		O			O	
0	2	-2	SDF2L1	5	0	5	SDF2L1		O			O	
0	3	-3	CAV3	6	2	4	CAV3		O			O	
1	5	-4	DNAJB8	5	0	5	DNAJB8		O			O	
2	1	1	AZGP1	4	0	4	AZGP1		O				
1	5	-4	GJC3	8	0	8	GJC3		O			O	

1 (CE)	1 (IE)	1 (CE)-1 (IE)	Nombre del gen	3 (CE)	3 (IE)	3 (CE)-3 (IE)	Nombre del gen						
0	6	-6	-SNORA44	10	0	10	SNORA44			O		O	
0	6	-6	PAFAH2	10	0	10	PAFAH2			O		O	
1	10	-9	MARK2	14	1	13	MARK2			O		O	
1	10	-9	FTH1	13	1	12	FTH1			O		O	
2	1	1	PPFIA1	4	0	4	PPFIA1			O			
0	5	-5	SCARNA11	5	0	5	SCARNA11			O		O	
7	0	7	NAV3	0	8	-8	NAV3		O				O
2	7	-5	CUL4A	13	0	13	CUL4A			O		O	
0	8	-8	METT10D	12	0	12	METT10D			O		O	
1	8	-7	ST6GALNAC1	12	0	12	ST6GALNAC1			O		O	

1 (CE)	1 (IE)	1 (CE)-1 (IE)	Nombre del gen	3 (CE)	3 (IE)	3 (CE)-3 (IE)	Nombre del gen				
2	15	-13	C19orf34	16	2	14	C19orf34		O	O	O
0	6	-6	GIGYF2	12	0	12	GIGYF2		O	O	O
0	5	-5	CXCR7	9	0	9	CXCR7		O	O	O
0	5	-5	ITCH	2	0	2	ITCH		O	O	O
1	3	-2	SULF2	3	0	3	SULF2		O	O	O
0	3	-3	WFDC13	3	0	3	WFDC13		O	O	O
1	4	-3	ZNFX1	3	0	3	ZNFX1		O	O	O
3	11	-8	HTT	16	1	15	HTT		O	O	O
2	12	-10	CEP72	17	1	16	CEP72		O	O	O
2	11	-9	PLEKHG4B	16	1	15	PLEKHG4B		O	O	O
0	7	-7	AGXT2L2	13	0	13	AGXT2L2		O	O	O
7	1	6	TYRP1	0	12	-12	TYRP1	O			O

Como resultado, se encontró que la inmunoterapia con alérgenos tiene una tendencia a ser eficaz para NAV3 and TYRP1 cuando el número de copias era 1, mientras que se halló que la inmunoterapia con alérgenos tiene una tendencia a ser eficaz para AGXT2L2, AZGP1, CAV3, CEP72, CUL4A, CXCR7, C19orf34, DNAJB8, FTH1, GEMIN4, GIGYF2, GJC3, ITCH, HTT, MARK2, METT10D, PAFAH2, PLEKHG4B, PPFA1, SCARNA11, SDF2L1, SNORA44, ST6GALNAC1, SULF2, WFDC13 y ZNFX1 cuando el número de copias era 3.

Por otro lado, se encontró que la inmunoterapia con alérgenos tiene una tendencia a ser ineficaz para AGXT2L2, CAV3, CEP72, CUL4A, CXCR7, C16orf48, C19orf34, DNAJB8, FTH1, GEMIN4, GIGYF2, GJC3, HTT, ITCH, MARK2, METT10D, NOB1, PAFAH2, PLEKHG4B, SCARNA11, SDF2L1, SMPD3, SNORA44, SRP14, ST6GALNAC1, SULF2, TMED6, WFDC13 y ZNFX1 1 cuando el número de copias era 2, mientras que se halló que la inmunoterapia con alérgenos tiene una tendencia a ser ineficaz para C12orf60, NAV3 y TYRP1 cuando el número de copias era 3.

Ejemplo 2

Búsqueda de genes que contribuyen a la evaluación de la eficacia con mayor probabilidad

De acuerdo con el presente ejemplo se realizó un análisis de regresión múltiple con el fin de buscar genes necesarios para llevar a cabo el juicio de eficacia con una probabilidad mayor.

Se obtuvo una expresión relacional entre una variable determinada y (a la que se hace referencia como una variable de criterio o una variable dependiente) y las variables $x_1, x_2, \dots, x_p$ que se considera que influyen sobre la variable y (a la que se hace referencia como variables explicativas o variables independientes) en base a la cual se puede predecir el valor y a partir de los valores $x_1, x_2, \dots, x_p$ o el nivel de contribución de cada x sobre la cual se puede evaluar dicha predicción. Dicho análisis se denomina análisis de regresión. En particular, el análisis se denomina análisis de regresión múltiple cuando hay dos o más variables explicativas.

De acuerdo con el presente ejemplo, para los 34 genes descritos anteriormente, se realizó un análisis de regresión múltiple basado en un modelo lineal general con una variable dependiente binomial y que representa la eficacia considerable y la ineficacia y con la variable explicativa trinomial que representa el número de copias de cada gen en el que 2 copias (VNC= 2) son el valor basal, incremento a partir del mismo (VNC= 3) como 1 y disminución a partir del mismo (VNC= 1) como -1, de modo que se selecciona un modelo AIC usando un algoritmo de eliminación retrógrada (valor fijado de la etapa: 10.000). En el presente modelo, un modelo AIC (modelo del "Criterio de información de Akaike") hace referencia a un indicador estadístico que con frecuencia se usa en todo el mundo y que se desarrolló con el fin de seleccionar el modelo, en el que se selecciona un modelo con el AIC mínimo dado una pluralidad de modelos para un conjunto de datos idénticos.

El análisis de regresión múltiple se realizó usando el software de programa R-2,9 (R Development Core Team).

Los resultados se muestran en la tabla 10.

[Tabla 10]

Relación entre el modelo de análisis e influencia del gen

Control de casos vs genes	Df	Suma de cuad.	RSS	AIC	Valor F	Pr(F)	β (coeficiente de regresión)
		< ninguno >	3,185	-97,936			0,3536
-TYRP1	1	0,162	3,346	-97,512	1,5722	0,2193	-0,2148
-MARK2	1	0,223	3,408	-96,626	2,1666	0,1511	0,7405
-NAV3	1	0,268	3,453	-95,975	2,6101	0,1163	0,3163
-CAV3	1	0,36	3,544	-94,696	3,4994	0,0709	-0,2938
-ZNFX1	1	0,392	3,576	-94,255	3,8111	0,06	-0,5182
-AGXT2L2	1	0,425	3,61	-93,793	4,1408	0,0505	0,4164
-FTH1	1	0,52	3,704	-92,531	5,0573	0,0318 *	-1,0428
-GEMIN4	1	0,532	3,717	-92,369	5,1774	0,0299 *	-0,6616
-SDF2L1	1	0,619	3,804	-91,238	6,0219	0,0199 *	-0,7666
-HTT	1	0,659	3,844	-90,722	6,414	0,0166 *	-0,5237
-C19orf34	1	0,743	3,928	-89,666	7,2288	0,0114 *	0,5029
-ITCH	1	0,789	3,974	-89,089	7,6818	0,0093 **	-0,8697
-AZGP1	1	0,793	3,977	-89,048	7,7139	0,0092 **	0,6013
-PLEKHG4B	1	0,818	4,003	-88,736	7,9609	0,0083 **	-1,0924

Relación entre el modelo de análisis e influencia del gen

Control de casos vs genes	Df	Suma de cuad.	RSS	AIC	Valor F	Pr(F)	β (coeficiente de regresión)
< ninguno >		3,185	-97,936				0,3536
-CEP72	1	1,004	4,189	-86,51	9,7721	0,0038 **	1,3694
-WFDC13	1	1,035	4,22	-86,15	10,0729	0,0034 **	1,1209
-METT10D	1	1,108	4,293	-85,308	10,7846	00025 **	0,9797

Como resultado, tras el proceso de selección escalonada de 18 etapas del modelo óptimo AIC se hallaron 17 genes con AIC = 97,94. Por tanto, se descubrió que el uso de los 17 genes mencionados anteriormente para el juicio de los grupos considerablemente eficaz/ineficaz era un modelo de análisis óptimo. El coeficiente de regresión β muestra la relación entre el número de copias y la eficacia. El valor β positivo (+) en el modelo de análisis significa que es probable que el incremento del número de copias (NC = 3) TRAS EL ANÁLISIS D ELOS GRUPOS considerablemente eficaz e ineficaz esté relacionado con el grupo considerablemente eficaz, mientras que β negativo (-) significa que es probable que la disminución del número de copias esté relacionado con el grupo ineficaz.

Ejemplo 3

Se realizó un análisis de ARNm mediante FACS usando ARNm derivado de basófilos fraccionados de la muestra de sangre extraída en el punto de extracción de sangre 7. Además, el análisis de la VNC se llevó a cabo para cada grupo de pacientes (22 pacientes del grupo de tratamiento considerablemente eficaz y 22 pacientes del grupo terapéuticamente ineficaz (total de 44 pacientes)). El modelo de análisis fue "evaluación de la eficacia (alivio) en 2008, VNC: ARNm (punto 7 de extracción de sangre después del tratamiento)". Aparte de los puntos descritos anteriormente, el análisis se llevó a cabo del mismo modo que el Ejemplo 1.

Específicamente para los 13.792 genes entrelazados con los símbolos génicos basados en datos de ARNm y datos de VNC, se realizó un modelo de análisis de regresión lineal usando tres parámetros, es decir el término de ensayo serológico, el valor de ARNm y el valor de VNC del modelo de análisis mencionado anteriormente como variables explicativas y el valor del juicio de eficacia del ensayo con extracto de polen de cedro en la primavera de 2008 como variables dependientes.

Los valores P y los niveles de contribución (valores R2 corregidos) se calcularon para aproximadamente 1,49 millones de análisis como el modelo de análisis. La clasificación se realizó mediante filtración usando como criterio el nivel de contribución del modelo de análisis a la línea de regresión. Después, la relación con el valor p se evaluó como el valor P corregido de Bonferroni.

El modelo de análisis resultante y cada variable explicativo se examinaron con detalle en términos de la asociación entre el valor del marcador sérico clínico, el valor del ARNm o el valor de la VCN y el fenotipo clínico, de modo que se obtiene un modelo candidato final.

Específicamente, con respecto a cada grado del modelo de análisis 1) (etapas 1 a 3) se usó el programa R-2,9 para calcular el valor R2 como el nivel de contribución y el valor P para una combinación en la cual un término cualquiera se modifica en proporción a la medida de otro término en asociación no aditiva, como término de interacción de tres términos de parámetros, es decir (a) fuerza de Log2 del gen del ARNm, (b) proporción Log2 relativa del segmento de VNC en el gen y (c) términos del ensayo serológico determinados antes y después del punto de obtención de ARNm/extracción de sangre. En el presente documento, se hizo que el valor de la extracción de sangre 6 correspondiera con el modelo de análisis.

Después del cálculo de los valores estadísticos, se realizó la filtración en la primera etapa para extraer combinaciones como combinaciones candidatas de R2 > 0,25 y el valor P < 0,00000363. Como resultado se obtuvieron 254 combinaciones. Entre estas combinaciones, se obtuvieron combinaciones mediante filtración de segunda etapa en la que los resultados del juicio de número de copias obtenido en el análisis de la VNC anterior se evaluaron de nuevo con respecto al número de copias VNC del gen.

Por tanto, el presente modelo de análisis y los términos del ensayo serológico se usaron para un análisis del modelo de regresión lineal general para extraer un término de ensayo serológico significativo (valor p < 0,05) en este análisis del modelo. Como resultado se obtuvieron 21 genes con 254 combinaciones (véanse las Tablas 11 y 12).

[Tabla 11]

Nombre del gen	Marcador sexológico en la 6ª extracción de sangre	Valor p*	Valor r2 corregido** [nivel de contribución]
CEDC127	CTACK	1,29E-06	0,3075297
	IFN.A2	1,21E-06	0,310647
	LIF	2,29E-06	0,3837115
	TRAIL	2,45E-06	0,318395
	SCF	4,63E-07	0,3765896
	SCGF.B	8,05E-08	0,3258075
	SDF.1A	3,16E-07	0,3258505
NCAM2	IL.16	1,14E-06	0,2813149
	CTACK	8,15E-07	0,2604172
	IFN.A2	2,52E-07	0,2963275
	SCGF.B	3,24E-06	0,2687564
	SDF.1A	3,76E-07	0,2868119
	IL.4	3,55E-07	0,3002483
	IFN.G	3,48E-07	0,3138113
PCDH17	1L.16	2,77E-06	0,3463412
	CTACK	6,92E-07	0,3508945
	SCGF.B	1,06E-06	0,3310659
	SDF.1A	1,57E-06	0,3600703
	IP.10	2,93E-07	0,3492307
C14orf180	CTACK	2,66E-06	0,2533242
	GROA	3,11E-06	0,3073281
	1FN.A2	2,36E-07	0,3666799
	SCGF.B	3,05E-06	0,2867621
	SDF.1A	7,57E-07	0,3960845
CHODL	IFN.A2	1,82E-06	0,296123
	SCGF.B	3,46E-06	0,2528756
	SDF.1A	3,24E-06	0,2693426
	IL.4	2,16E-06	0,2695358
	IFN.G	2,06E-06	0,2713536
SIVA1	CTACK	2,66E-06	0,2803814
	GROA	3,11E-06	0,4118834
	1FN.A2	2,36E-07	0,3924536
	SCGF.B	3,05E-06	0,3543863
	SDF.1A	7,57E-07	0,4137064
TNFRSF14	CTACK	9,24E-07	0,2722765
	IFN.A2	6,95E-07	0,2955877
	SCF	2,49E-06	0,3615561
	SCGF.B	8,12E-07	0,3256602
	SDF.1A	1,71E-06	0,2925794
AHNAK2	CTACK	1,62E-06	0,3082199
	GROA	2,05E-06	0,3626634
	1FN.A2	9,30E-07	0,307904
	SGGF.B	2,18E-06	0,3541045
C14orf79	CTACK	1,62E-06	0,2183435
	GROA	2,05E-06	0,3336502
	IFN.A2	9,30E-07	0,292211

Nombre del gen	Marcador sexológico en la 6ª extracción de sangre	Valor p*	Valor r2 corregido** [nivel de contribución]
LOC25845 (LRRRC14B)	SCGF.B	2,18E-06	0,3084159
	CTACK	4,31E-07	0,2945138
	1FN.A2	4,50E-07	0,3275292
	SCGF.B	2,09E-06	0,2520615
	SDF.1A	7,61E-07	0,3274352
PLD4	CTACK	1,62E-06	0,2732138
	GROA	2,05E-06	0,2801979
	IFN.A2	9,30E-07	0,3069721
	SCGF.B	2,18E-06	0,2869556
GPR132	CTACK	1,62E-06	0,297574
	GROA	2,05E-06	0,2691575
	IFN.A2	9,30E-07	0,2601031
LOC389257	TRAIL	2,45E-06	0,2564211
	SCF	4,63E-07	0,2802226
	SCGF.B	8,05E-08	0,3102645
BRF1	CTACK	1,62E-06	0,2503298
	IFN.A2	9,30E-07	0,2765277
BTG3	IFN.G	3,43E-06	0,2513725
	IP.10	6,82E-07	0,3204643
DIAPH3	SCGF.B	8,03E-07	0,2637675
	IFN.G	2,46E-06	0,2646007
GBA3	IFN.A2	2,29E-06	0,2611828
	IP.10	1,38E-07	0,2665606
IFRD1	IFN.A2	1,19E-06	0,3225129
	IP.10	1,28E-06	0,277858
KCNT2	IL.4	2,64E-06	0,2651524
	IFN.G	1,83E-06	0,2613099
THOC7	IFN.A2	2,33E-06	0,2570067
	IP.10	2,14E-06	0,3409871
TMEM168	IFN.A2	1,19E-06	0,3046113
	IP.10	1,28E-06	0,2508919

*Valor P ajustado mediante corrección de Bonferroni [P < 0,05]

**valor r2 > 0,25

Las correlaciones entre el número de copias VNC de cada gen y la condición clínica se muestran en las Tablas 6 a 8.

5

[Tabla 12]

Nombre del gen	Nomenclatura estándar
CCDC127	“Dominio de hélice enrollada que contiene 127”
NCAM2	“Molécula de adhesión 2 a las células neuronales”
PCDH17	“Protocaderina 17”
C14orf180	“Marco de lectura abierto 180 del cromosoma 14”
CHODL	“Condrolectina”
SIVA1	“Factor inductor de la apoptosis”
TNFRSF14	Miembro 14 de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral (mediador de la entrada del virus herpes)”.
AHNAK2	“Nucleoproteína 2”

Nombre del gen	Nomenclatura estándar
C14orf79	"Marco de lectura abierto 79 del cromosoma 14"
LOC25845	"_"
PLD4	"Miembro 4 de la familia D de fosfolipasa"
GPR132	"Receptor 132 acoplado a proteína G"
LOC389257	"Repetición rica en leucina que contiene 14B"
BRF1	"Homólogo de BRF1, subunidad del factor de iniciación de la transcripción IIIB de la ARN polimerasa III (S. cerevisiae)"
BTG3	"Familia BTG, miembro 3"
DIAPH3	"Homólogo 3 diáfano (Drosophila)"
GBA3	"Glucosidasa, beta, ácido 3 (citósólica)"
IFRD1	"Regulador 1 del desarrollo relacionado con el interferón"
KCNT2	"Miembro 2, subfamilia T, de canales de potasio"
THOC7	"Homólogo 7 del complejo TH0 (Drosophila)"
TMEM168	"Proteína transmembrana 168"

Dianas del análisis

Considerablemente eficaz: 22 pacientes

Ineficaz: 22 pacientes

Aparte de los genes descritos anteriormente, los siguientes genes también eran sugestivos de su significado. Por tanto, en el presente ejemplo, se analizaron 39 genes consistentes en los 21 genes mencionados anteriormente que se descubrió que tenían significado, así como los siguientes 13 genes que se ha sugerido que tienen significado (Tabla 13).

[Tabla 13]

Nombre del gen	Nomenclatura estándar	Número de acceso
ADSSL1	"Adenilosuccinato sintasa de tipo 1"	NM_152328
BST1	"Antígeno de células estromales de la médula ósea 1"	NM_004334
C7orf53	"Marco de lectura abierto 53 del cromosoma 7"	NM_001134468
CD38	"Molécula CD38"	NM_001775
DCUN1D1	"DCN1, defectivo en la nedilación de culina 1, dominio que contiene 1"	NM_020640
FGFBP1	"Proteína 1 de unión al factor de crecimiento de fibroblastos"	NM_005130
FOXP2	"Caja forkhead P2"	NM_001172766
GLRB	"Receptor beta de la glicina"	NM_000824
GTF2B	"Factor de transcripción general IIB"	NM_001514
HSP90AB2P	"Proteína del shock térmico de 90 kDa alfa (citósólica), miembro 2 de clase B (seudogen)"	NR_003132
MCCC1	"Metilcrotonoil-CoA carboxilasa 1 (alfa)"	NM_020168
MDFIC	"Dominio inhibidor de la familia MyoD que contiene"	NO_001166345
ODF2L	"Fibra externa densa de colas de espermatozoide de tipo 2"	NM_001007022
PDGFC	"Factor C de crecimiento derivado de las plaquetas"	NM_016205
sep15	"Selenoproteína de 15 kDa"	NM_004261
SH3GLB1	"Dominio SH3 de endofilina B1 de tipo GRB2"	NM_016009
TDRD3	"Dominio tudor que contiene 3"	NM_001146070
YEATS2	"Dominio YEATS que contiene 2"	NM_018023

De un modo similar al Ejemplo 1, centrándose en el número de copias VNC de los pacientes con eficacia de tratamiento considerable (22 casos) y pacientes con ineficacia del tratamiento (22 casos) para cada gen, el número de pacientes que tiene un número de copias VNC de 1 se comparó con el número de pacientes que tiene un número de copias VNC de 3 para el gen con el fin de llevar a cabo la puntuación de los números de copia VNC. Los resultados obtenidos aplicando las puntuaciones a los pacientes se muestran en la Tabla 14. Además, las

puntuaciones para cada paciente se suman y los resultados que muestran la distribución de la puntuación total para cada paciente se muestran en la tabla 15.

[Tabla 14]

[illegible]

[Tabla 15]

(personas)			(cont.)			(personas)			
Punt.	Recuento								Total
	(CE)	(IE)							
39	1	0	-1	0	0	~ -1	0	1 ~	
38	2	0	-2	0	0	(CE)	1	5	16
37	0	0	-3	0	0	(IE)	14	7	1
36	0	0	-4	1	0				22
35	1	0	-5	0	0	(CE): Considerablemente eficaz			
34	0	0	-6	0	0	(IE): Ineficaz			
33	0	0	-7	0	0				
32	0	0	-8	0	1				
31	1	0	-9	0	0				
30	1	0	-10	0	0				
29	0	0	-11	0	1				
28	0	0	-12	0	0				
27	0	0	-13	0	0				
26	0	0	-14	0	0				
25	0	0	-15	0	0				
24	1	0	-16	0	0				
23	0	0	-17	0	1				
22	0	0	-18	0	0				
21	0	0	-19	0	1				
20	1	0	-20	0	1				
19	0	0	-21	0	1				
18	0	0	-22	0	0				
17	0	0	-23	0	0				
16	2	0	-24	0	1				
15	1	0	-25	0	0				
14	1	0	-26	0	1				
13	0	0	-27	0	0				
12	2	0	-28	0	2				
11	0	0	-29	0	0				
10	1	0	-30	0	1				
9	0	0	-31	0	0				
8	0	0	-32	0	1				
7	0	0	-33	0	1				
6	0	1	-34	0	0				
5	0	0	-35	0	0				
4	0	0	-36	0	1				
3	1	0	-37	0	0				
2	0	0	-38	0	0				
1	0	0	-39	0	0				
0	5	7	Total	22	22				

La selección de los genes diana se llevó a cabo de acuerdo con los criterios siguientes para cada una de las variaciones, es decir, la VNC de 1 o 3, cuando la diferencia en el número de personas entre el grupo de tratamiento considerablemente eficaz y el grupo de tratamiento ineficaz era igual o superior a 2.

- (a) Considerablemente eficaz cuando la VNC es 1
- (b) Considerablemente eficaz cuando la VNC es 3
- (c) Ineficaz cuando la VNC es 1
- (d) Ineficaz cuando la VNC es 3

Los genes que entran dentro de los criterios descritos anteriormente se muestran en la Tabla 16. En la Tabla 16, los círculos están marcados a la derecha para los genes que entran dentro de los criterios descritos anteriormente.

[Tabla 16]

(CE): Considerablemente eficaz													*Criterio de juicio: diferencia de 2 o más				
(IE): Ineficaz																	
Nombre del gen	(CE)			(IE)			L(CE)-L(IE)			G(CE)-G(IE)		(a) Juzgable con L (CE)	(b) Juzgable con L (IE)	(c) Juzgable con G (CE)	(d) Juzgable con G (IE)		
	L	N	G	L	N	G											
CCDC127	1	6	15	9	12	1	-8		14			O	O				
NCAM2	11	11	0	0	9	13	11		-13	O				O			
PCDH17	7	15	0	1	9	12	6		-12	O				O			
C14orf180	0	7	15	10	12	0	-10		15		O		O				
CHODL	10	12	0	0	10	12	10		-12	O				O			
SIVA1	0	7	15	10	12	0	-10		15		O		O				
TNFRSF14	1	6	15	12	10	0	-11		15		O		O				
AHNAK2	0	7	15	10	12	0	-10		15		O		O				
C14orf79	0	7	15	10	12	0	-10		15		O		O				
LOC25845	1	5	16	10	11	1	-9		15		O		O				
PLD4	0	7	15	10	12	0	-10		15		O		O				
GPR132	0	7	15	10	12	0	-10		15		O		O				
LOC389257	1	6	15	9	12	1	-8		14		O		O				
BRF1	0	7	15	10	12	0	-10		15				O				
BTG3	10	12	0	0	10	12	10		-12	O				O			
DIAPH3	8	14	0	1	9	12	7		-12	O				O			
GBA3	6	16	0	0	11	11	6		-11	O				O			
IFRD1	8	14	0	0	10	12	8		-12	O				O			
KCNT2	7	15	0	0	12	10	7		-10	O				O			
THOC7	5	17	0	0	14	8	5		-8	O				O			
TMEM168	8	14	0	0	10	12	8		-12	O				O			
ADSSL1	0	7	15	10	12	0	-10		15		O		O				
BST1	5	17	0	0	10	12	5		-12	O				O			
C7orf53	8	14	0	0	10	12	8		-12	O				O			
CD38	5	17	0	0	14	8	5		-8	O				O			

(CE): Considerablemente eficaz										*Criterio de juicio: diferencia de 2 o más									
(IE): Ineficaz																			
	(CE)				(IE)				L(CE)-L(IE)	G(CE)-G(IE)	(a) Juzgable con L (CE)	(b) Juzgable con L (IE)	(c) Juzgable con G (CE)	(d) Juzgable con G (IE)					
	L	N	G		L	N	G												
Nombre del gen																			
DCUN1D1	4	18	0	0	21	1	4		-1	O									
FGFBP1	5	17	0	0	14	8	5		-8	O				O					
FOXP2	8	14	0	0	10	12	8		-12	O				O					
GLRB	6	16	0	0	17	5	6		-5	O				O					
GTF2B	4	18	0	0	20	2	4		-2	O				O					
HSP90AB2P	5	17	0	0	14	8	5		-8	O				O					
MCCC1	4	18	0	0	21	1	4		-1	O									
MDFIC	8	14	0	0	10	12	8		-12	O				O					
ODF2L	4	18	0	0	20	2	4		-2	O				O					
PDGFC	6	16	0	0	17	5	6		-5	O				O					
SEP15	4	18	0	0	20	2	4		-2	O				O					
SH3GLB1	4	18	0	0	20	2	4		-2	O				O					
TDRD3	8	14	0	1	9	12	7		-12	O				O					
YEATS2	4	18	0	0	21	1	4		-1	O									

Como resultado, se encontró que la inmunoterapia con alérgenos tenía una tendencia a ser eficaz para NCAM2, PCDH17, CHODL, BTG3, DIAPH3, GBA3, IFRD1, KCNT2, THOC7, TMEM168, BST1, C7orf53, CD38, DCUN1D1, FGFBP1, FOXP2, GLRB, GTF2B, HSP90AB2P, MCCC1, MDFIC, ODF2L, PDGFC, SEP15, SH3GLB1, TDRD3 y YEATS2 cuando el número de copias era 1, mientras que se encontró que la inmunoterapia con alérgenos tenía una

5 tendencia a ser eficaz para CCDC127, C14orf180, SIVA1, TNFRSF14, AHNAK2, C14orf79, LOC25845, PLD4, GPR132, LOC389257, BRF1 y ADSSL1 cuando el número de copias era 3.

Por otro lado, se encontró que la inmunoterapia con alérgenos tenía una tendencia a ser ineficaz para CCDC127, C14orf180, SIVA1, TNFRSF14, AHNAK2, C14orf79, LOC25845, PLD4, GPR132, LOC389257, BRF1 y ADSSL1

10 cuando el número de copias era 1, mientras que se encontró que la inmunoterapia con alérgenos tenía una tendencia a ser ineficaz para NCAM2, PCDH17, CHODL, BTG3, DIAPH3, GBA3, IFRD1, KCNT2, THOC7, TMEM168, BST1, C7orf53, CD38, FGFBP1, FOXP2, GLRB, GTF2B, HSP90AB2P, MDFIC, ODF2L, PDGFC, SEP15, SH3GLB1 y TDRD3 cuando el número de copias era 3.

15 **Aplicabilidad industrial**

La presente invención puede detectar si la inmunoterapia con alérgenos es o no eficaz en un paciente con alergia inmediata. Se puede usar un método de la presente invención para seleccionar un tratamiento o un fármaco terapéutico para una alergia inmediata.

20

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la eficacia de la inmunoterapia con alérgenos para una alergia inmediata en un sujeto, comprendiendo el método las etapas de: detectar una variación del número de copias de al menos un gen seleccionado del siguiente grupo de genes en una muestra que se va a analizar obtenida del sujeto; comparar el resultado obtenido de detectar la variación del número de copias con datos de la variación del número de copias del mismo gen de la población parental para correlacionar con la eficacia de la inmunoterapia con alérgenos:

<Grupo de genes>

AGXT2L2, AZGP1, CAV3, CEP72, CUL4A, CXCR7, C12orf60, C16orf48, C19orf34, DNAJB8, FTH1, GEMIN4, GIGYF2, GJC3, HTT, ITCH, MARK2, METT10D, NAV3, NOB1, PAFAH2, PLEKHG4B, PPFA1, SCARNA11, SDF2L1, SMPD3, SNORA44, SRP14, ST6GALNAC1, SULF2, TMED6, TYRP1, WFDC13, ZNFX1, NCAM2, PCDH17, CHODL, BTG3, DIAPH3, GBA3, IFRD1, KCNT2, THOC7, TMEM168, BST1, C7orf53, CD38, DCUN1D1, FGFBP1, FOXP2, GLRB, GTF2B, HSP90AB2P, MCCC1, MDFIC, ODF2L, PDGFC, SEP15, SH3GLB1, TDRD3, YEATS2, CCDC127, C14orf18, SIVA1, TNFRSF14, AHNAK2, C14orf79, LOC25845, PLD4, GPR132, LOC389257, BRF1 y ADSSL1.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el resultado de detectar la variación del número de copias se correlaciona con la eficacia de la inmunoterapia con alérgenos en base a cualquiera de los siguientes criterios de juicio (a) a (d) o una combinación de los mismos:

(a) la inmunoterapia con alérgenos es eficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en NAV3, TYRP1, NCAM2, PCDH17, CHODL, BTG3, DIAPH3, GBA3, IFRD1, KCNT2, THOC7, TMEM168, BST1, C7orf53, CD38, DCUN1D1, FGFBP1, FOXP2, GLRB, GTF2B, HSP90AB2P, MCCC1, MDFIC, ODF2L, PDGFC, SEP15, SH3GLB1, TDRD3 y YEATS2 es menor que el número de copias más frecuente del mismo gen de la población parental;

(b) la inmunoterapia con alérgenos es eficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en AGXT2L2, AZGP1, CAV3, CEP72, CUL4A, CXCR7, C19orf34, DNAJB8, FTH1, GEMIN4, GIGYF2, GJC3, ITCH, HTT, MARK2, METT10D, PAFAH2, PLEKHG4B, PPFA1, SCARNA11, SDF2L1, SNORA44, ST6GALNAC1, SULF2, WFDC13, ZNFX1, CCDC127, C14orf180, SIVA1, TNFRSF14, AHNAK2, C14orf79, LOC25845, PLD4, GPR132, LOC389257, BRF1 y ADSSL1 es mayor que el número de copias más frecuente del mismo gen de la población parental;

(c) la inmunoterapia con alérgenos es ineficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en AGXT2L2, CAV3, CEP72, CUL4A, CXCR7, C16orf48, C19orf34, DNAJB8, FTH1, GEMIN4, GIGYF2, GJC3, ITCH, HTT, MARK2, METT10D, NOB1, PAFAH2, PLEKHG4B, SCARNA11, SDF2L1, SMPD3, SNORA44, SRP14, ST6GALNAC1, SULF2, TMED6, WFDC13, ZNFX1, CCDC127, C14orf180, SIVA1, TNFRSF14, AHNAK2, C14orf79, LOC25845, PLD4, GPR132, LOC389257, BRF1 y ADSSL1 es menor que el número de copias más frecuente del mismo gen de la población parental; y

(d) la inmunoterapia con alérgenos es ineficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en C12orf60, NAV3, TYRP1, NCAM2, PCDH17, CHODL, BTG3, DIAPH3, GBA3, IFRD1, KCNT2, THOC7, TMEM168, BST1, C7orf53, CD38, FGFBP1, FOXP2, GLRB, GTF2B, HSP90AB2P, MDFIC, ODF2L, PDGFC, SEP15, SH3GLB1 y TDRD3 mayor que el número de copias más frecuente del mismo gen de la población parental.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el resultado de detectar la variación del número de copias se correlaciona con la eficacia de la inmunoterapia con alérgenos en base a cualquiera de los siguientes criterios de juicio (e) a (h) o una combinación de los mismos:

(e) la inmunoterapia con alérgenos es eficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en NAV3, TYRP1, NCAM2, PCDH17, CHODL, BTG3, DIAPH3, GBA3, IFRD1, KCNT2, THOC7, TMEM168, BST1, C7orf53, CD38, DCUN1D1, FGFBP1, FOXP2, GLRB, GTF2B, HSP90AB2P, MCCC1, MDFIC, ODF2L, PDGFC, SEP15, SH3GLB1, TDRD3 y YEATS2 es 1;

(f) la inmunoterapia con alérgenos es eficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en AGXT2L2, AZGP1, CAV3, CEP72, CUL4A, CXCR7, C19orf34, DNAJB8, FTH1, GEMIN4, GIGYF2, GJC3, ITCH, HTT, MARK2, METT10D, PAFAH2, PLEKHG4B, PPFA1, SCARNA11, SDF2L1, SNORA44, ST6GALNAC1, SULF2, WFDC13, ZNFX1, CCDC127, C14orf180, SIVA1, TNFRSF14, AHNAK2, C14orf79, LOC25845, PLD4, GPR132, LOC389257, BRF1 y ADSSL1 es 3;

(g) la inmunoterapia con alérgenos es ineficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en AGXT2L2, CAV3, CEP72, CUL4A, CXCR7, C16orf48, C19orf34, DNAJB8, FTH1, GEMIN4, GIGYF2, GJC3, ITCH, MARK2, METT10D, NOB1, PAFAH2, PLEKHG4B, SCARNA11, SDF2L1, SMPD3, SNORA44, SRP14, ST6GALNAC1, SULF2, TMED6, WFDC13, ZNFX1, CCDC127, C14orf180, SIVA1, TNFRSF14, AHNAK2, C14orf79, LOC25845, PLD4, GPR132, LOC389257, BRF1 y ADSSL1 es 1; y

(h) la inmunoterapia con alérgenos es ineficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en C12orf60, NAV3, TYRP1, NCAM2, PCDH17, CHODL, BTG3, DIAPH3, GBA3, IFRD1, KCNT2, THOC7, TMEM168, BST1, C7orf53, CD38, FGFBP1, FOXP2, GLRB, GTF2B, HSP90AB2P, MDFIC, ODF2L, PDGFC, SEP 15, SH3GLB1 y TDRD3 es 3;

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la inmunoterapia con alérgenos es inmunoterapia con alérgenos sublingual.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la alergia inmediata es al menos una seleccionada del grupo que consiste en alergia al polen, urticaria, alergia a alimentos, alergia a ácaros, rinitis alérgica, asma bronquial y dermatitis atópica.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la muestra que se va a analizar es sangre o una célula inmunitaria.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la muestra que se va a analizar es de linfocitos T CD4, una célula dendrítica o un basófilo.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la muestra que se va a analizar es ARNm extraído de la célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la inmunoterapia con alérgenos es inmunoterapia con alérgenos sublingual y en el que la alergia inmediata es alergia al polen de cedro.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el resultado de detectar la variación del número de copias se correlaciona con la eficacia de la inmunoterapia con alérgenos en base a cualquiera de los siguientes criterios de juicio (a) a (d) o una combinación de los mismos:
 - (a) la inmunoterapia con alérgenos es eficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en NAV3, TYRP1, NCAM2, PCDH17, CHODL, BTG3, DIAPH3, GBA3, IFRD1, KCNT2, THOC7, TMEM168, BST1, C7orf53, CD38, DCUN1D1, FGFBP1, FOXP2, GLRB, GTF2B, HSP90AB2P, MCCC1, MDFIC, ODF2L, PDGFC, SEP15, SH3GLB1, TDRD3 y YEATS2 es menor que el número de copias más frecuente del mismo gen de la población parental;
 - (b) la inmunoterapia con alérgenos es eficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en AGXT2L2, AZGP1, CAV3, CEP72, CUL4A, CXCR7, C19orf34, DNAJB8, FTH1, GEMIN4, GIGYF2, GJC3, ITCH, HTT, MARK2, METT10D, PAFAH2, PLEKHG4B, PPFA1, SCARNA11, SDF2L1, SNORA44, ST6GALNAC1, SULF2, WFDC13, ZNFX1, CCDC127, C14orf180, SIVA1, TNFRSF14, AHNK2, C14orf79, LOC25845, PLD4, GPR132, LOC389257, BRF1 y ADSSL1 es mayor que el número de copias más frecuente del mismo gen de la población parental;
 - (c) la inmunoterapia con alérgenos es ineficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en AGXT2L2, CAV3, CEP72, CUL4A, CXCR7, C16orf48, C19orf34, DNAJB8, FTH1, GEMIN4, GIGYF2, GJC3, HTT, ITCH, MARK2, METHOD, NOB1, PAFAH2, PLEKHG4B, SCARNA11, SDF2L1, SMPD3, SNORA44, SRP14, ST6GALNAC1, SULF2, TMED6, WFDC13, ZNFX1, CCDC127, C14orf180, SIVA1, TNFRSF14, AHNK2, C14orf79, LOC25845, PLD4, GPR132, LOC389257, BRF1 y ADSSL1 es menor que el número de copias más frecuente del mismo gen de la población parental; y
 - (d) la inmunoterapia con alérgenos es ineficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en C12orf60, NAV3, TYRP1, NCAM2, PCDH17, CHODL, BTG3, DIAPH3, GBA3, IFRD1, KCNT2, THOC7, TMEM168, BST1, C7orf53, CD38, FGFBP1, FOXP2, GLRB, GTF2B, HSP90AB2P, MDFIC, ODF2L, PDGFC, SEP15, SH3GLB1 y TDRD3 mayor que el número de copias más frecuente del mismo gen de la población parental.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el resultado de detectar la variación del número de copias se correlaciona con la eficacia de la inmunoterapia basada en alérgenos en base a cualquiera de los siguientes criterios de juicio (e) a (h) o una combinación de los mismos:
 - (e) la inmunoterapia con alérgenos es eficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en NAV3, TYRP1, NCAM2, PCDH17, CHODL, BTG3, DIAPH3, GBA3, IFRD1, KCNT2, THOC7, TMEM168, BST1, C7orf53, CD38, DCUN1D1, FGFBP1, FOXP2, GLRB, GTF2B, HSP90AB2P, MCCC1, MDFIC, ODF2L, PDGFC, SEP15, SH3GLB1, TDRD3 y YEATS2 es 1;
 - (f) la inmunoterapia con alérgenos es eficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en AGXT2L2, AZGP1, CAV3, CEP72, CUL4A, CXCR7, C19orf34, DNAJB8, FTH1, GEMIN4, GIGYF2, GJC3, ITCH, HTT, MARK2, METT10D, PAFAH2, PLEKHG4B, PPFA1, SCARNA11, SDF2L1, SNORA44, ST6GALNAC1, SULF2, WFDC13, ZNFX1, CCDC127, C14orf180, SIVA1, TNFRSF14, AHNK2, C14orf79, LOC25845, PLD4, GPR132, LOC389257, BRF1 y ADSSL1 es 3;
 - (g) la inmunoterapia con alérgenos es ineficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en AGXT2L2, CAV3, CEP72, CUL4A, CXCR7, C16orf48, C19orf34, DNAJB8, FTH1, GEMIN4, GIGYF2, GJC3, HTT, ITCH, MARK2, METT10D, NOB1, PAFAH2, PLEKHG4B, SCARNA11, SDF2L1, SMPD3, SNORA44, SRP14, ST6GALNAC1, SULF2, TMED6, WFDC13, ZNFX1, CCDC127, C14orf180, SIVA1, TNFRSF14, AHNK2, C14orf79, LOC25845, PLD4, GPR132, LOC389257, BRF1 y ADSSL1 es 1; y
 - (h) la inmunoterapia con alérgenos es ineficaz cuando el número de copias de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en C12orf60, NAV3, TYRP1, NCAM2, PCDH17, CHODL, BTG3, DIAPH3, GBA3, IFRD1,

KCNT2, THOC7, TMEM168, BST1, C7orf53, CD38, FGFBP1, FOXP2, GLRB, GTF2B, HSP90AB2P, MDFIC, ODF2L, PDGFC, SEP 15, SH3GLB1 y TDRD3 es 3;

- 5 12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la muestra que se va a analizar es sangre o una célula inmunitaria.
13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la muestra que se va a analizar es linfocitos T CD4, una célula dendrítica o un basófilo.
- 10 14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la muestra que se va a analizar es ARNm extraído de la célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 y 13.

Figura 1

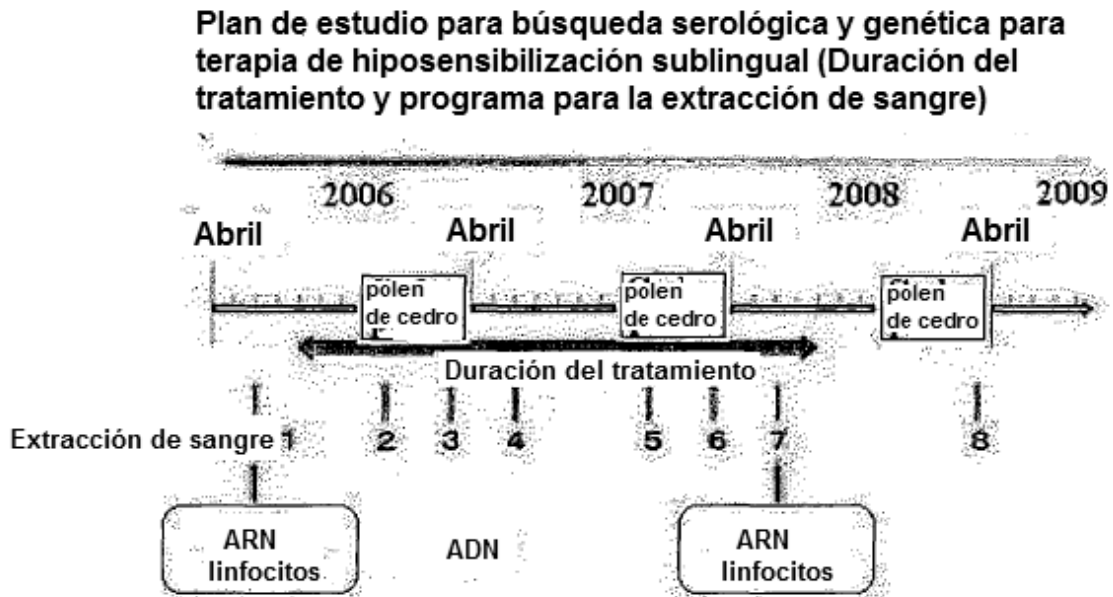


Figura 2

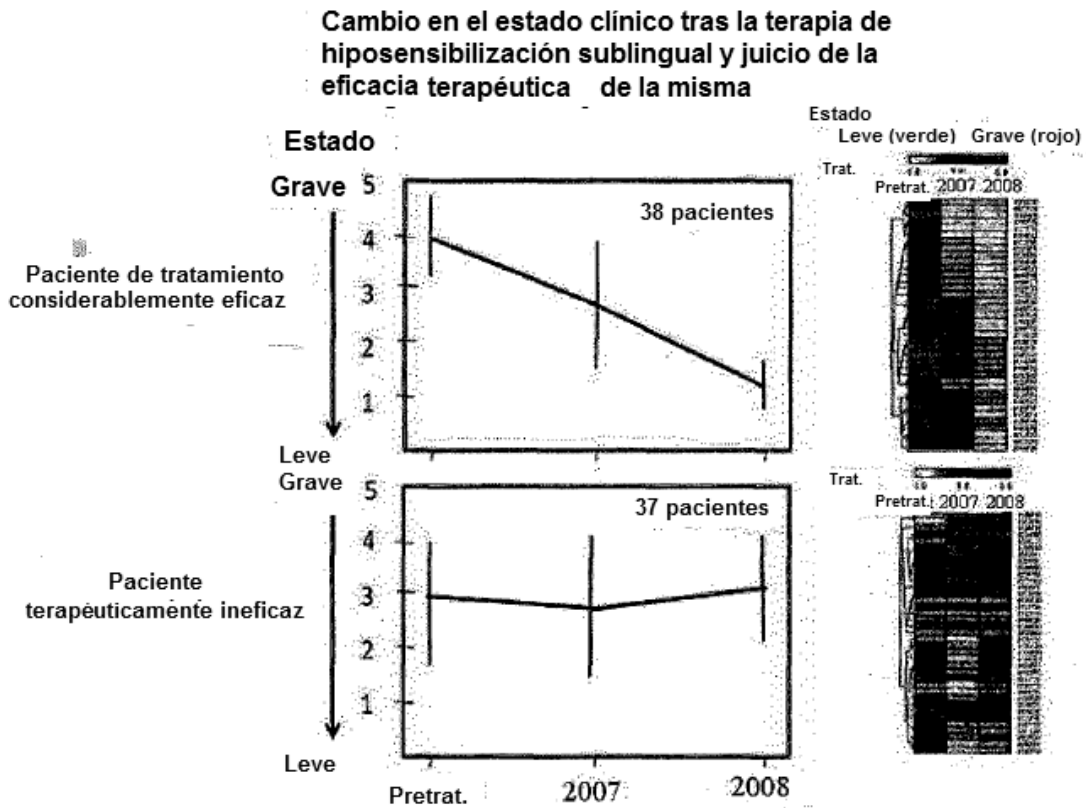


Figura 3

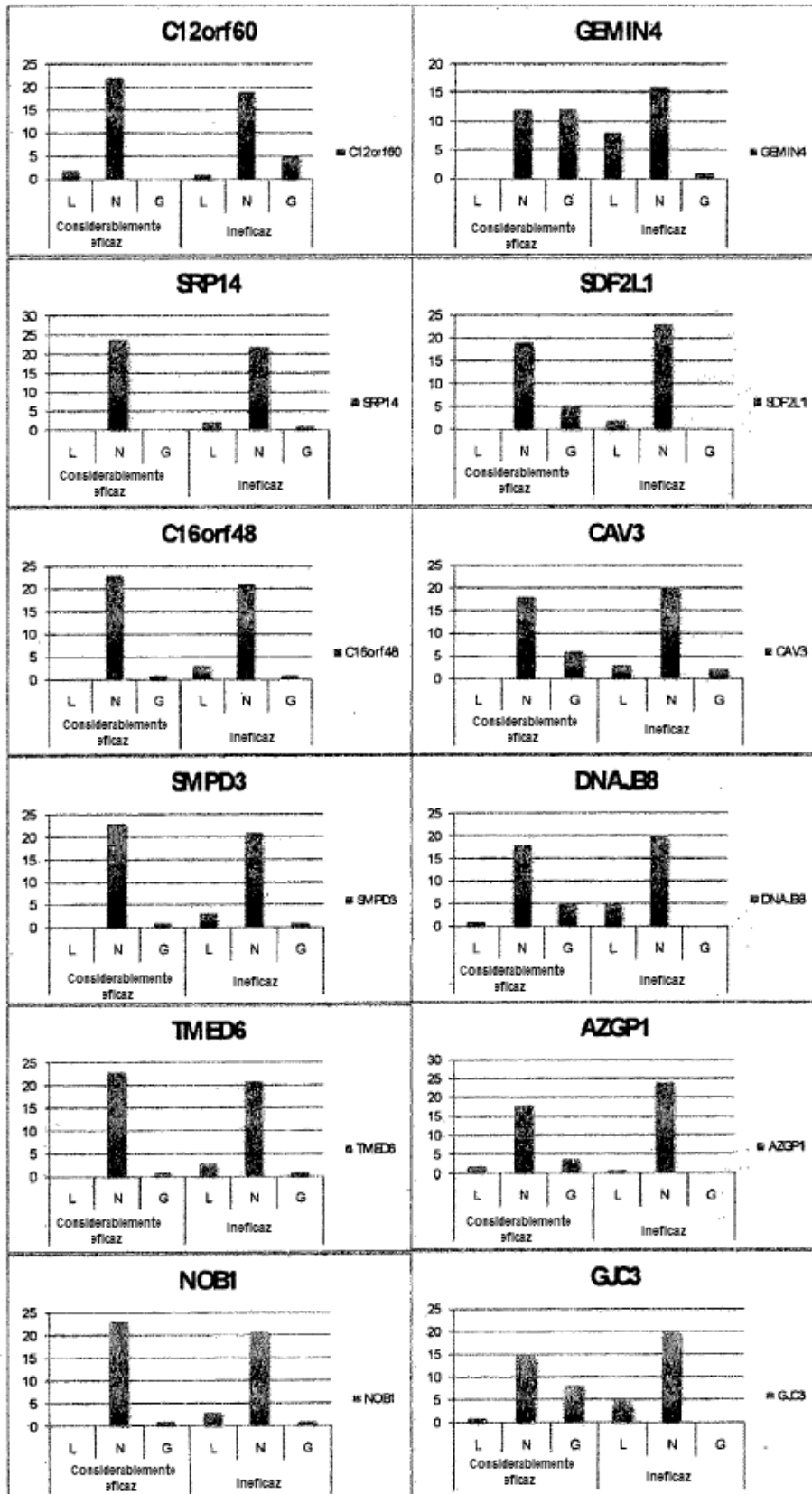


Figura 4

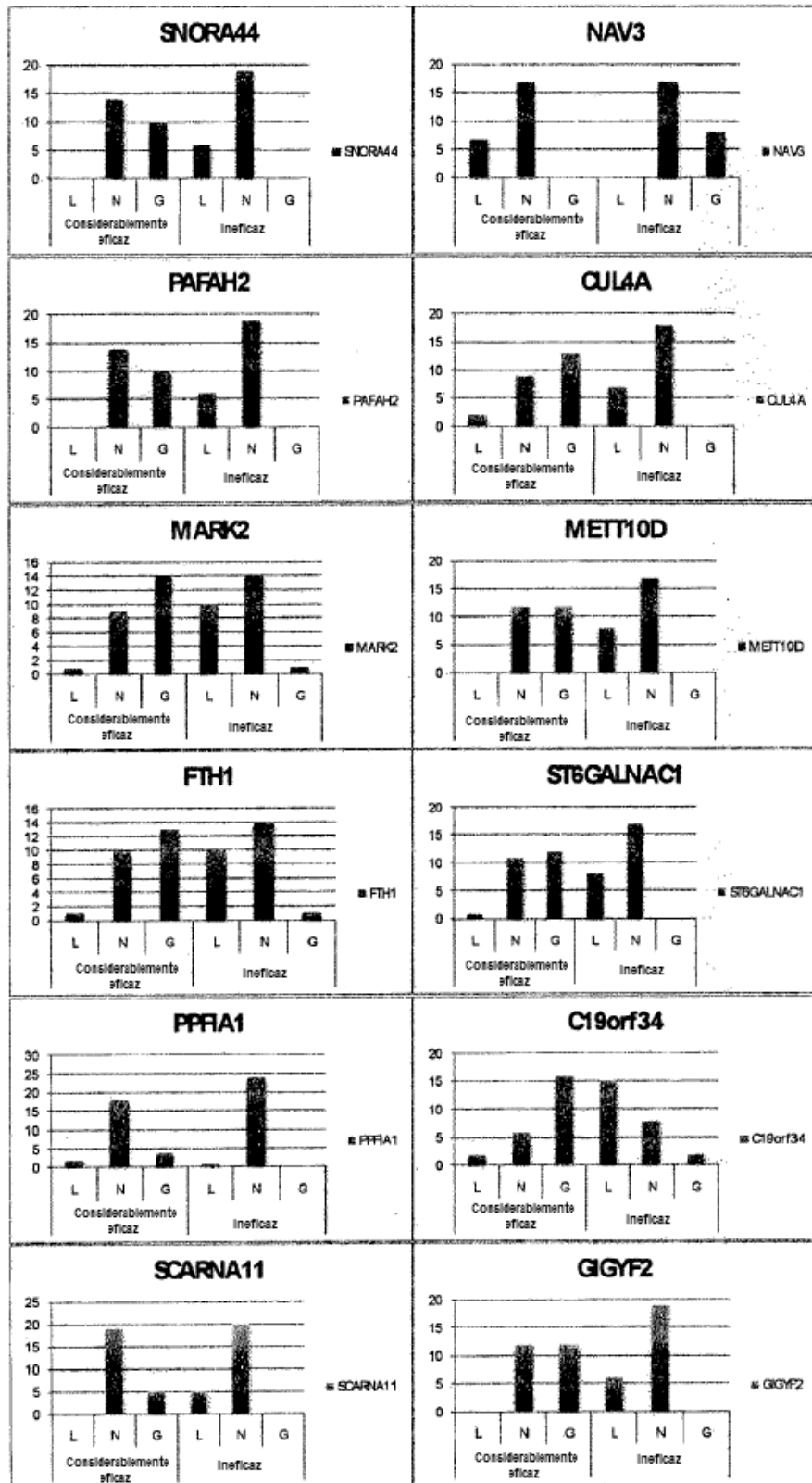


Figura 5

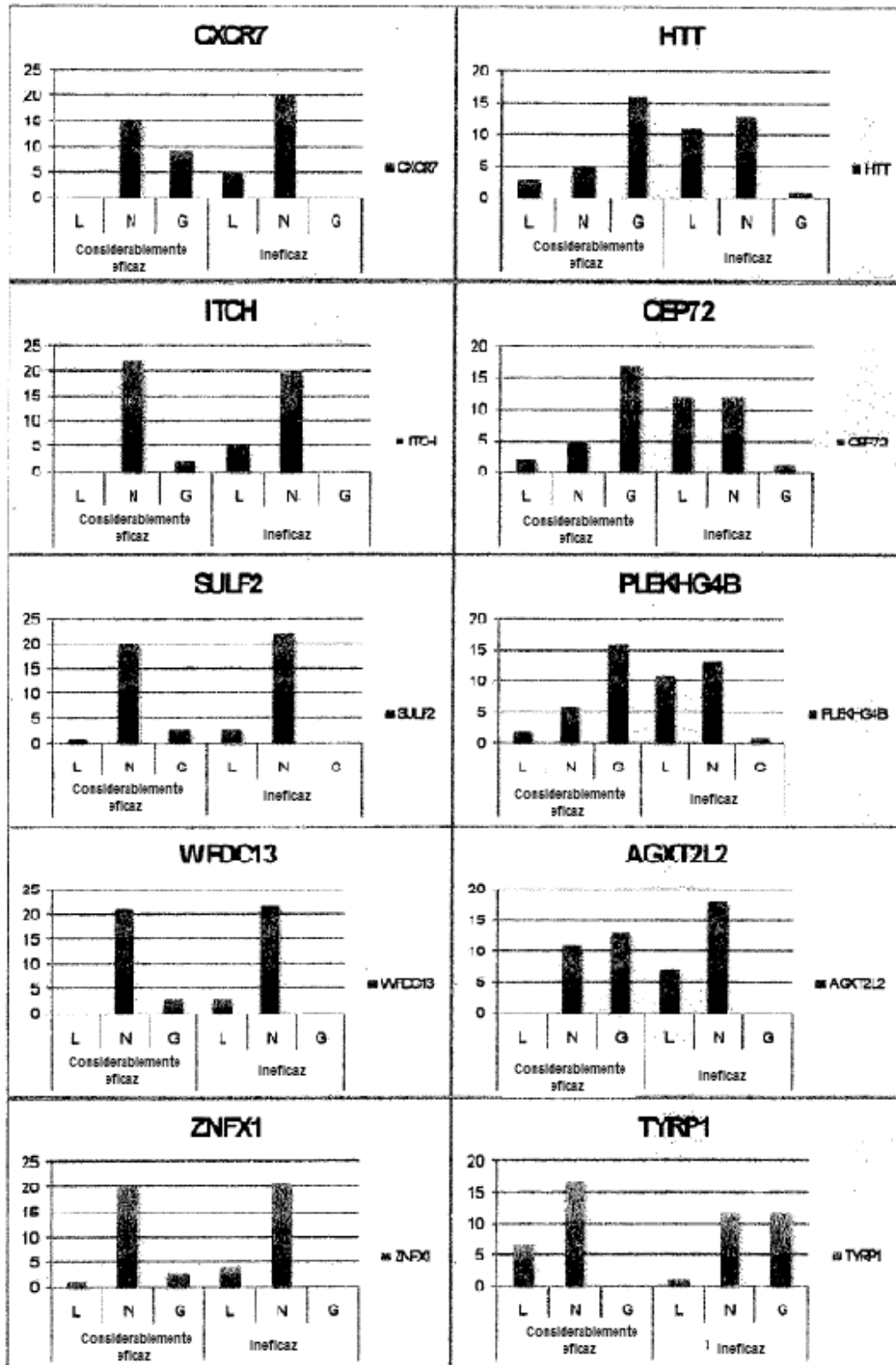


Figura 6

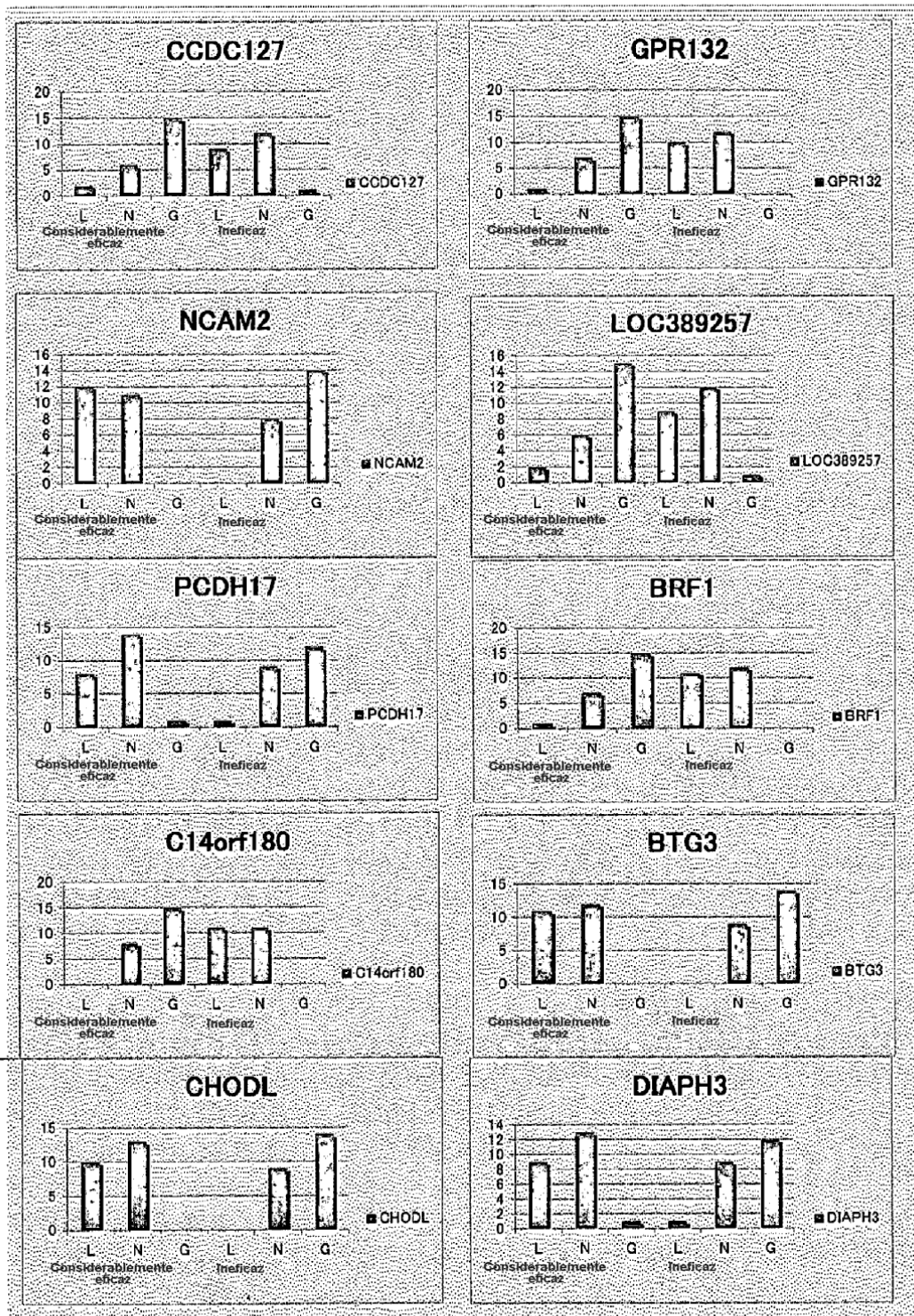


Figura 7

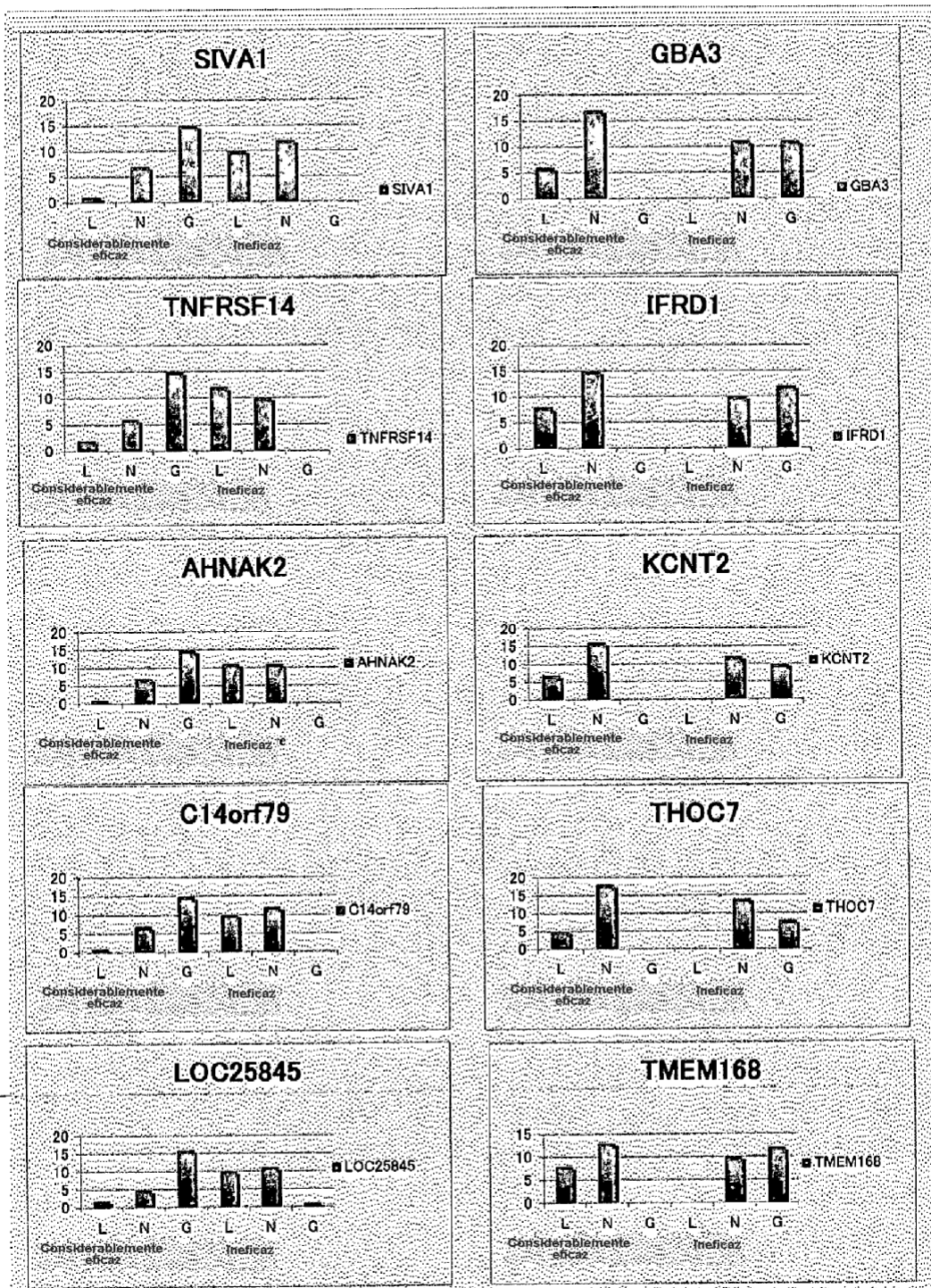


Figura 8

