

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 084**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2010 E 10709859 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2411533**

54 Título: **Marcadores genéticos de la gravedad de la esclerosis múltiple**

30 Prioridad:

27.03.2009 EP 09156487
31.03.2009 US 165141 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.05.2016

73 Titular/es:

MERCK SERONO S.A. (100.0%)
Centre Industriel
1267 Coinsins, CH

72 Inventor/es:

ABDERRAHIM, HADI;
WOJCIK, JÉRÔME;
ESPOSITO, FEDERICA y
DEBAILLEUL, VIRGINIE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 569 084 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

Marcadores genéticos de la gravedad de la esclerosis múltiple

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de polimorfismos de un solo nucleótido (abreviadamente SNP, por sus iniciales en inglés) para identificar su asociación con la gravedad de la esclerosis múltiple (EM) en un sujeto.

Antecedentes de la invención

10 La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria y desmielinizante crónica del sistema nervioso central (SNC), que comienza frecuentemente a la edad adulta temprana. La EM se considera una enfermedad compleja, ya que probablemente se combinan múltiples factores genéticos y no genéticos para influir en el riesgo de la enfermedad. La evidencia del papel de los factores genéticos es convincente y está apoyada por estudios en gemelos, hermanos uniparentales y adoptados. Aunque la EM comienza por lo general con un curso de recaída-remisión (RR), la mayoría de los pacientes entra más adelante en una fase progresiva secundaria (PS), mientras que otros, frecuentemente con un inicio más tardío, pueden entrar directamente en un progreso primario (PP).

15 Las exploraciones del genoma han excluido la presencia de un *locus* de sensibilidad principal en la EM además de la región clase II de los antígenos linfocitarios humanos (abreviadamente HLA, por sus iniciales en inglés), y no han podido revelar más que unos cuantos supuestos *locus* de sensibilidad¹⁻³. Dentro del complejo de genes HLA, se han indicado asociaciones con varios alelos de HLA-DRB1⁴, mientras que algunas pruebas sugieren también un factor independiente de riesgo de la EM en la región clase I de los HLA⁵⁻⁷. Muy recientemente, están aumentando las pruebas que demuestran la importancia del gen IL7Ra en la EM⁸⁻¹⁰. Sin embargo, es claro que aún no se han identificado otros factores genéticos de riesgo.

20 La sensibilidad a la EM es inequívocamente un rasgo genético complejo. El curso y el resultado clínicos de la EM difieren ampliamente y parece probable que mientras algunos genes pueden estar implicados en la inducción de la enfermedad, otros pueden tener un papel que influye en la gravedad de la enfermedad^{11,12}. La gravedad de la EM se evalúa como el desarrollo de la discapacidad en función de la duración de la enfermedad, pero puede complicarse por el hecho de que la velocidad de progreso difiere de cuando en cuando y que los pacientes pueden mostrar también períodos de mejora. El método más ampliamente utilizado para la evaluación clínica de la gravedad de la EM se basa en la escala expandida del estado de discapacidad (EEED¹³). Tradicionalmente, se ha usado ampliamente el índice de progreso (IP = puntuación en la EEED/duración en años), pero su uso se ve dificultado por las razones mencionadas anteriormente. Más recientemente, se ha propuesto la puntuación de la gravedad de la EM (PGEM) como una nueva propuesta, relacionando puntuaciones en la EEED con la distribución de la discapacidad en pacientes con duraciones de la enfermedad comparables, compensando parcialmente la debilidad del IP¹⁴.

25 Se han analizado varios genes candidatos para determinar una posible asociación con la gravedad de la EM (véase¹⁵ para revisión). La mayoría de ellos no presentan ninguna prueba de asociación genética con el pronóstico de la EM: apolipoproteína ε (APOE, véase¹⁶ para revisión), ataxia espino-cerebelosa 2 (SCA2¹⁷), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF¹⁸), receptor 4 tipo Toll (TLR4¹⁹), osteopontina²⁰, linfocitos T 4 citotóxicos asociados (CD152 o CTLA4) y CD28²¹ y receptor de quimioquinas CC 5 (CCR5) y HLA-DRB1*1501²². Se ha encontrado que sólo unos cuantos *locus* están asociados con el resultado clínico de la EM: el *locus* de la interleuquina-1 en el cromosoma 2q12-14 contiene 3 genes (IL-1α, IL-1β y el antagonista del receptor IL-1, IL-1RN) en los que se encontraron 6 sitios, 5 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y un número variable de repeticiones en tándem (abreviadamente VNTR, por sus iniciales en inglés) que estaban asociados con la gravedad medida por EEED clasificada en tres categorías de gravedad²³; en el promotor de la interleuquina-10, se describieron dos marcadores de microsatélites como diferencialmente representados entre las categorías de progreso de la enfermedad leve (IP < 0,5) y grave (IP > 0,5)²⁴; se han encontrado dos SNP asociados con categorías de la EM (recaída-remisión - RR frente al progreso primario - PP), pero no con el pronóstico medido por la PGEM en el gen ADAMTS14²⁵; y se han demostrado que la incidencia y gravedad de la enfermedad han aumentado en el modelo de murido MOG-EAE deficiente en CD59a²⁶. Sin embargo, estos estudios se basaron en números limitados de individuos y no se repitió ninguno. Además, todos estos estudios utilizaron propuestas categóricas para detectar la asociación con la gravedad: los pacientes se clasifican en las formas de la EM leve/moderada/grave o leve/grave eligiendo umbrales de corte en los volúmenes de lesión, la EEED, el IP o las escalas de la PGEM y se comparan las frecuencias de alelos y genotipos entre categorías.

30 El documento WO2006/076641 muestra tres SNP de MGAT5 identificados en pacientes con EM y la determinación de los SNP en ambos alelos. D4 describe también que la gravedad de la enfermedad EM está relacionada inversamente con MGAT5. Finalmente, D4 describe el tratamiento de pacientes con EM con beta-interferón, por ejemplo, Avonex o Rebif.

35 40 45 50 55 Ambrosius M., *et al.*: *Clinical Biochemistry*, vol 42, nº 1-2, January 2009 (2009-01), páginas 1-4 describen la genotipificación de ambos alelos de tres SNP en el gen XYLT1 por PCR y la digestión por restricción y que un SNP en el gen XYLT1 está vinculado a una menor producción de glicano.

En vista de la importancia de la EM existe la necesidad de identificar marcadores, en particular, marcadores genéticos, útiles en pacientes con EM. En particular, existe la necesidad de identificar marcadores genéticos útiles para predecir la sensibilidad y en particular la gravedad de la enfermedad EM.

Sumario de la invención

5 La presente invención en un aspecto se refiere a un método para predecir la gravedad de la EM, determinando el tipo de nucleótido en los SNP rs2059283 y/o rs12927173 en uno o ambos de los alelos del marcador dialélico, como se define en la reivindicación 1.

Se describen uno o más SNP seleccionados del grupo que consiste en los SNP rs3814022, rs4953911, rs2059283, rs12927173, rs2495725, rs1343522, rs4573623, rs333548, rs10508075, rs2839580, rs2495725, rs3814022, 10 rs1078922, rs4315313, los SNP en desequilibrio de ligamiento (DL) con uno o más de estos SNP para uso en la predicción en un individuo de la gravedad de la enfermedad esclerosis múltiple.

Incluso en otro aspecto, la invención se refiere a interferón-beta para uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple en un individuo, como se define en la reivindicación 7, comprendiendo dicho método las etapas: a) aplicar un método como se describe anteriormente a una muestra *in vitro* de un individuo; b) tratar dicho individuo identificado que presenta uno o más de los marcadores antes descritos y que ha sido identificado por presentar un cierto nivel de gravedad de la enfermedad esclerosis múltiple. 15

Descripción detallada de la invención

A continuación, se describirá con más detalle la invención en donde los ejemplos están destinados a ilustrarla sin que se interprete que limitan su alcance.

20 Breve descripción de las tablas y figuras:

Figura 1. Distribución de la PGEM.

Histograma de la distribución de la puntuación de la gravedad de la EM en 1.040 pacientes con EM.

Figura 2. Estimación de la tasa de falsos descubrimientos (abreviadamente FDR, por sus iniciales en inglés *False Discovery Rate*) de las asociaciones con la gravedad.

25 La FDR se estimó con 10.000 series de PGEM aleatorias y se representó frente al número de tasas (*R*) positivas seleccionadas, para $R \leq 100$ (línea gruesa). Esta curva da la proporción estimada de falsas positivas para un número dado de positivas (por ejemplo se estima que el 90% de los 40 SNP más probablemente asociados ($R \leq 40$) son falsos positivos) o el número de positivas para una tasa de falsos descubrimientos dada (por ejemplo, sólo un SNP se selecciona en el umbral del 40% de FDR). Las líneas discontinuas representan los límites del intervalo de confianza de estimación del 95%. 30

Figura 3. Ejemplos de SNP asociados con la gravedad de la enfermedad.

Los gráficos de dispersión de la izquierda representan las distribuciones de la PGEM en toda la población (negro: (1) columna más a la izquierda) y para los individuos que tienen el homocigoto más común (rojo: (2) 2ª columna desde la izquierda), el heterocigoto (azul: 3ª columna desde la izquierda) y el homocigoto menos común (verde: columna 35 más a la derecha) para el SNP considerado. Las líneas horizontales (de los gráficos) indican los valores medios de la PGEM (desviaciones típicas) dentro de las categorías. A la derecha están representadas las funciones de distribución acumulativas.

Figura 3.1: SNP 1 cromosoma 4 desierto, rs6552511

Figura 3.2: SNP 2 cromosoma 17 desierto, rs7221818

40 **Figura 3.3:** SNP 3 y 4. XYLT1, rs12927173 y rs2059283

Figura 3.4: SNP 5, 7 y 11. HIF1AN, rs1343522, rs4573623 y rs2495725

Figura 3.5: SNP 6 y 12. MGAT5, rs4953911 y rs3814022

Figura 3.6: SNP 8. MEGF11, rs333548

Figura 3.7: SNP 9. FGF14, rs10508075

45 **Figura 3.8:** SNP 10. PDE9A, rs2839580

Figura 3.9: SNP 13. MTPN, rs1078922

Figura 3.10: SNP 14. CDH13, rs4315313

Figura 4. Replicación de los SNP en XYLT1 y MGAT5.

Diagramas de dispersión de la asociación (la misma leyenda que en la Fig. 3) de 3 SNP en el conjunto de datos de replicación de 873 muestras independientes. Los dos primeros SNP superiores están situados en el gen MGAT5 y el tercero está en el gen XYLT1.

5 A continuación se recogen los SNP y las secuencias de contexto

SEQ ID NO:	SNP	ID por Affymetrix	Cromosoma	Posición Build 36	Orientación de la sonda por Affymetrix	Secuencia de los SNP (Sonda Affymetrix)	Alelo de gravedad	2º alelo
1	rs6552511	SNP_A-2197927	4	182,688,603	inversa	CATTGCAACTCATCTAY ACCTGTAACCTCTTGT	C	T
2	rs7221818	SNP_A-1840594	17	5,817,571	inversa	TAGCCGTTGTTGTCCAY CTCCTCCAATAGAAATG	C	T
3	rs12927173	SNP_A-1786151	16	17,378,819	inversa	GGCTGGCTGTCCCGCCR AACAAAGAGCCTGGAT	A	G
4	rs2059283	SNP_A-1789137	16	17,376,995	directa	TTGACCAGCCTTATCAM ATCTGACTGTATTTCC	A	C
5	rs1343522	SNP_A-2207833	10	102,358,149	inversa	CCCAAAGATGCCGGACR GATACCCCAAGAGGTG	G	A
6	rs4953911	SNP_A-1820391	2	134,785,264	inversa	GTTTATAAAAACTCTCW GAAACCTCAAAGAACA	T	A
7	rs4573623	SNP_A-2267721	10	102,361,371	inversa	GAATCAGGTTCTGATCR AGATCCACAAATTTTA	G	A
8	rs333548	SNP_A-2291412	15	64,032,551	directa	GCAATTACCGGTAAGCY ATGAGAGTAGTGGGGG	T	C
9	rs10508075	SNP_A-2180140	13	101,237,184	directa	TGTTGCTGACAATTAAR CCACATAGCATTTATA	G	A
10	rs2839580	SNP_A-1970543	21	43,030,160	inversa	TTGCATCTTTGGGTTAM GGCTCTGCTGCCCTTG	A	C
11	rs2495725	SNP_A-2004530	10	102,353,994	inversa	AGTCCCTAAGTGCCACR AATGAAAAGAAGACTC	A	G
12	rs3814022	SNP_A-1947235	2	134,764,389	directa	TTTAATTCCCCACAAAS AGCTGAGTGGCTCTTG	G	C
13	rs1078922	SNP_A-2309210	7	135,334,923	inversa	GGAAAACAAATTTTCCR CTTCTAAGGCTGTAA	G	A
14	rs4315313	SNP_A-1884943	16	81,644,218	inversa	TGAATGAGATAAATTCAY GTGAGGCTCTTAGAAA	C	T

Códigos de los SNP de la IUPAC:

Código de la IUPAC	SNP
R	G o A
Y	T o C
M	A o C
K	G o T
S	G o C
W	A o T

Se describe un método para la genotipificación que comprende las etapas: a) usar un ácido nucleico aislado de una muestra de un individuo; y b) determinar el tipo de nucleótido en los SNP: rs3814022, rs4953911, rs2059283, rs12927173, rs2495725, rs1343522, rs4573623, rs333548, rs10508075, rs2839580, rs2495725, rs3814022, rs1078922 y/o rs4315313 en uno o ambos de los alelos del marcador dialélico y/o en un SNP en desequilibrio de ligamiento (DL) con uno o más de estos SNP.

Los SNP de interés particular se seleccionan preferiblemente de: rs3814022, rs4953911, rs2059283, rs12927173, rs2495725, rs1343522 y/o rs4573623.

Se describen los SNP en desequilibrio de ligamiento (DL) con uno o más de los SNP identificados, tal como se expresa por un coeficiente de correlación del DL r^2 mayor que 0,8 en al menos una población de al menos 100 individuos, preferiblemente un coeficiente de correlación del DL r^2 mayor que 0,95.

"Asociación" de un marcador, por ejemplo un SNP, con la gravedad de un paciente de esclerosis múltiple de acuerdo con la invención significa la diferencia estadísticamente significativa de las frecuencias del marcador entre dos poblaciones de pacientes que tienen diferentes niveles de gravedad de esclerosis múltiple.

La "gravedad" de la esclerosis múltiple (EM) se puede expresar de acuerdo con la invención con cualquier medio conocido en el campo de la EM, como por ejemplo la escala expandida del estado de discapacidad (EEED) o con otras técnicas o mediciones o definiciones usadas comúnmente en su campo. La expresión "actividad residual de la enfermedad" utilizada con frecuencia en este contexto y en su campo se ha de entender como una indicación de un cierto nivel de actividad de la enfermedad EM, por ejemplo, que presenta síntomas clínicos, como los definidos en cualquiera de las mediciones o definiciones aplicadas generalmente en el campo de la EM. Un indicador o medición de la "actividad residual de la enfermedad" puede ser la experiencia de la o las recaídas o del progreso de la enfermedad como, por ejemplo, medido por la escala expandida del estado de discapacidad (EEED) o formación de imágenes por resonancia magnética (IRM). Como intervalo de tiempo, un ejemplo es la evaluación durante dos años del tratamiento. Se aprecia que se pueden definir y utilizar otros intervalos de tiempo, por ejemplo, un año, tres años u otros como se suelen aplicar en los protocolos de estudios clínicos y son bien conocidos por los expertos. El intervalo de tiempo de referencia se puede elegir de modo que permita una medición y una lectura apropiadas. Igualmente aplicables son otras mediciones aceptadas del estado de la enfermedad, como por ejemplo, la puntuación básica de la esclerosis múltiple de Cambridge (abreviadamente CAMBS, por la expresión en inglés) y otros utilizados por los expertos. Existen varias definiciones de un ataque de EM en su campo y los expertos en la técnica de la EM entenderán que se pueden aplicar de acuerdo con la invención. Por consiguiente, existen varias posibilidades para los expertos en la técnica de que se puedan aplicar cuando realizan la invención. Ejemplos de la evaluación o diagnóstico de la EM están publicados en Kurzke J. F., *Neuroepidemiology*, 1991, 10: 1-8; Kurzke J. F., *Neurology*, 1983, 33: 1444-1452; McDonald W.I., *et al.*, *Ann. Neurol.*, 2001, 50: 121-127; Polman C. H., *et al.*, *Ann. Neurol.*, 2005, 58: 840-846. En consecuencia, un marcador de la gravedad o SNP puede representar un marcador que indica una gravedad de la enfermedad alta o baja en un paciente en comparación con la población de EM.

"Respuesta" o "pacientes que responden" al tratamiento con interferón en un individuo al que se ha diagnosticado EM, que padece EM o un paciente de EM en el sentido de la presente invención, se entiende que es la actividad residual de la enfermedad de acuerdo con los criterios establecidos más adelante en tratamiento con interferón, en particular con interferón-beta 1a o 1b y, en particular Rebif[®], Avonex[®], Cinnovex[®], Betaseron[®] y Extavia[®], de un paciente con EM. La respuesta se puede definir y/o medir como el aumento con el tiempo del progreso de la enfermedad medido, por ejemplo, en la escala expandida del estado de discapacidad (EEED) o con otras técnicas o mediciones o definiciones usadas comúnmente en su campo. En particular, ha de entenderse como no progreso o no empeoramiento de la EM o un perfil/actividad clínico estable o como la mejora de la EM en, por ejemplo signos clínicos o medida con otros medios como, por ejemplo, IRM o análisis del LCR (líquido cefalorraquídeo). En particular, se puede entender como recaídas/ataques/agravamiento menos frecuentes o recaídas/ataques/agravamiento más suaves.

Como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, "un" o "uno" significa uno o más salvo indicación explícita contraria.

Un "alelo" es una forma particular de un gen, marcador genético u otro *locus* genético, que es distinguible de otras formas del gen, marcador genético o de otro *locus* genético; por ejemplo, sin limitación, por su secuencia de nucleótidos particular. El término alelo también incluye, por ejemplo, sin limitación, una forma de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP). Un individuo puede ser homocigoto para un determinado alelo en células diploides; es decir, el alelo en ambos pares de cromosomas es idéntico; o heterocigótico para dicho alelo; es decir, los alelos en ambos pares de cromosomas no son idénticos.

Un "marcador genético" es un *locus* genético polimórfico identificable. Un ejemplo sin limitación de un marcador genético es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP). Un "marcador" puede ser un marcador genético o cualquier otro marcador, por ejemplo, el nivel de expresión de un gen particular a nivel de nucleótidos, como mRNA, útil en el contexto de la invención como indicativo de una respuesta al tratamiento con interferón.

Un "genotipo" como se usa en la presente memoria se refiere a la combinación de ambos alelos de un marcador genético, por ejemplo, sin limitación, de un SNP, en un único *locus* genético en los cromosomas emparejados (homólogos) de un individuo. "Genotipo" como se usa en la presente memoria se refiere también a la combinación de alelos de más de un *locus* genético, por ejemplo, sin limitación, de los SNP, en un par o más de un par de cromosomas homólogos de un individuo.

"Genotipificación" es un proceso para determinar un genotipo de un individuo.

"Locus" o "*locus* genético" se refiere a una localización específica en un cromosoma u otro material genético.

"Oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico o un derivado de ácido nucleico; incluyendo, sin limitación, un ácido nucleico bloqueado (abreviadamente LNA, por su expresión en inglés *Locked Nucleic Acid*), ácido nucleico peptídico (abreviadamente PNA, por su expresión en inglés *Peptide Nucleic Acid*) o ácido nucleico con puentes (abreviadamente BNA, por su expresión en inglés *Bridged Nucleic Acid*); que generalmente tiene una longitud entre 5 y 100 bases contiguas y más frecuentemente una longitud entre 5-40, 5-35, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-50, 10-40, 10-30, 10-25, 10-20, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25, 15-20, 20-50, 20-40, 20-30 o 20-25 bases contiguas. La secuencia de un oligonucleótido se puede diseñar para que se hibride específicamente a cualquiera de las formas alélicas de un marcador genético; dichos oligonucleótidos se denominan sondas específicas de alelos. Si el marcador genético es un SNP, el alelo complementario para dicho SNP puede estar en cualquier posición dentro de una sonda específica de alelo. Otros oligonucleótidos útiles en la práctica de la invención se hibridan específicamente a una región diana adyacente a un SNP con su extremo 3' situado uno a menos o igual a aproximadamente 10 nucleótidos desde el *locus* del marcador genético, preferiblemente \leq aproximadamente 5 nucleótidos. Dichos oligonucleótidos que se hibridan adyacentes a un SNP son útiles en métodos de extensión del cebador mediada por polimerasa y se denominan en la presente memoria "oligonucleótidos de extensión del cebador". En una realización preferida, el extremo 3' de un oligonucleótido de extensión del cebador es un desoxinucleótido complementario al nucleótido situado inmediatamente adyacente a un SNP.

"Polimorfismo" se refiere a dos o más formas alternativas (alelos) en una población de un *locus* genético que difiere en la secuencia de nucleótidos o que tiene un número variable de unidades de nucleótidos repetidas. Los polimorfismos se presentan en regiones codificadoras (exones), regiones no codificadoras de genes o fuera de los genes. Los diferentes alelos de un polimorfismo ocurren típicamente en una población a diferentes frecuencias, produciéndose el alelo más frecuentemente en una población seleccionada denominada algunas veces el alelo "más común". Los organismos diploides pueden ser homocigóticos o heterocigóticos para los diferentes alelos que existen. Un polimorfismo dialélico tiene dos alelos. En dicho método, preferiblemente la identidad de los nucleótidos en dichos marcadores dialélicos se determina para ambas copias de dichos marcadores dialélicos presentes en dicho genoma del individuo. Se puede aplicar cualquier método conocido por los expertos en la técnica, preferiblemente dicha determinación se realiza por un ensayo de microsecuenciación. Además, es posible amplificar una porción de una secuencia que comprende el marcador dialélico antes de dicha etapa de determinación, por ejemplo, por PCR. Sin embargo, se puede utilizar cualquier método aplicable.

Se describe ahora que la presencia de un alelo de gravedad está caracterizado en rs3814022 por G, en rs4953911 por T, en rs2059283 por A, en rs12927173 por A, en rs2495725 por A, en rs1343522 por G, en rs4573623 por G, una T en rs333548, una G en rs10508075, una A en rs2839580, una A en rs2495725, una G en rs3814022, una G en rs1078922 y/o una C en rs4315313 y que es indicativo de la gravedad de la enfermedad esclerosis múltiple. En el SNP particular la base respectiva, A, T, C, G, está presente en un alelo o preferiblemente en ambos alelos y en consecuencia es indicativa de la gravedad de la EM. En particular, un SNP puede indicar que un individuo probablemente está más gravemente afectado por la EM o puede representar un marcador indicativo de estar menos gravemente afectado por la EM en comparación con la población media de EM.

La descripción proporciona por tanto ventajosamente un medio para hacer una distinción entre diferentes pacientes y diferentes grupos de pacientes de la población total con EM y, en particular, clasificarlos de acuerdo con la gravedad de la enfermedad. En este estado de la técnica se aplican métodos y aparatos de biología molecular, como PCR y métodos cíclicos de PCR, y algoritmos de estadística conocidos generalmente por los expertos en la técnica. Los pacientes pueden por tanto ser agrupados en cuanto a su gravedad de la EM prevista de acuerdo con la PGEM en, por ejemplo muy graves, de gravedad media, no muy graves y ligeramente graves. La descripción proporciona, por tanto, una herramienta que tiene implicaciones en el mejor tratamiento de estos pacientes de acuerdo con su etapa y gravedad de la enfermedad. En particular, será ahora posible adaptar mejor la dosificación de tratamiento y el esquema de tratamiento a un nivel del paciente individual.

La descripción se refiere a uno o más SNP seleccionados del grupo que consiste en: rs3814022, rs4953911, rs2059283, rs12927173, rs2495725, rs1343522, rs4573623, rs333548, rs10508075, rs2839580, rs2495725, rs3814022, rs1078922, rs4315313, los SNP en desequilibrio del ligamiento (DL) con uno o más de estos SNP para uso en la predicción de la gravedad de la enfermedad esclerosis múltiple en un individuo.

La invención se refiere a un método para predecir la gravedad de la enfermedad esclerosis múltiple en un individuo, como se define en la reivindicación 1.

Los SNP descritos se seleccionan del grupo que consiste en: rs3814022, rs4953911, rs2059283, rs12927173, rs2495725, rs1343522, rs4573623, rs333548, rs10508075, rs2839580, rs2495725, rs3814022, rs1078922, rs4315313, los SNP en desequilibrio del ligamiento (DL) con uno o más de estos SNP.

5 Los SNP de interés particular se seleccionan preferiblemente de: rs3814022, rs4953911, rs2059283, rs12927173, rs2495725, rs1343522 y/o rs4573623.

Otro aspecto la invención se refiere al interferón-beta para uso en un método para tratar la esclerosis múltiple en un individuo, como se define en la reivindicación 7.

Los SNP descritos son: rs3814022, rs4953911, rs2059283, rs12927173, rs2495725, rs1343522 y/o rs4573623.

10 El método se puede utilizar en particular ventajosamente para estratificar y ajustar la dosis de interferón y/o el tiempo de tratamiento. Una posible medida puede ser un tratamiento con alta dosis o un tratamiento antes de que sean visibles los signos clínicos de la EM en un paciente identificado como muy gravemente afectado por la EM. Se puede aplicar IRM para analizar el estado de enfermedad de un paciente y se puede realizar una agrupación/clasificación del paciente de acuerdo con estos resultados como se ha señalado anteriormente. Será particularmente ventajoso para un paciente con EM identificado de acuerdo con la invención como que tiene un alto riesgo de ser un paciente con EM que se verá gravemente afectado por la enfermedad, ser tratado en un tiempo temprano con el fin de controlar la enfermedad en las etapas tempranas. Por tanto, se pueden elegir las mediciones apropiadas, como un tratamiento con interferón y una dosificación adecuados. Además, el conocimiento del paciente apoyará el cumplimiento del tratamiento. Un mayor cumplimiento tiene a su vez efectos positivos sobre los resultados del tratamiento como tal y su eficacia.

20 Preferiblemente, el interferón-beta (IFN) es el interferón beta 1a o 1b. Ejemplos de interferón-beta son Rebif[®], Avonex[®], Cinnovex[®], Betaseron[®] o Extavia[®].

25 La dosificación de IFN administrado en el método o uso anterior, como dosis única o múltiple, a un individuo variará además los resultados de la agrupación de pacientes dependiendo de una variedad de factores, incluyendo las propiedades farmacocinéticas, la vía de administración, las condiciones y características del paciente (sexo, edad, peso, salud, tamaño), extensión de los síntomas, tratamientos concurrentes, frecuencia del tratamiento y efecto deseado.

Las dosificaciones estándares del IFN-beta humano varían entre 80.000 UI/kg y 200.000 UI/kg al día o 6 MUI (millones de unidades internacionales) y 12 MUI por persona al día o 22 a 44 µg (microgramos) por persona. De acuerdo con la presente invención, el IFN se puede administrar preferiblemente a una dosificación de aproximadamente 1 a 50 µg, más preferiblemente de aproximadamente 10 a 30 µg o aproximadamente 10 a 20 µg por persona al día.

30 La administración de los ingredientes activos puede ser por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Una vía de administración preferida para el IFN es la vía subcutánea.

El IFN también se puede administrar diariamente o cada dos días, o con menos frecuencia. Preferiblemente, el IFN se administra una, dos o tres veces a la semana.

35 Una vía de administración preferida es la administración subcutánea, administrada, por ejemplo, tres veces a la semana. Una vía de administración más preferida es la administración intramuscular, que puede, por ejemplo, aplicarse una vez a la semana.

40 Preferiblemente de 22 a 44 µg o 6 MUI a 12 MUI del IFN-beta se administran tres veces a la semana por inyección subcutánea. El IFN-beta se puede administrar por vía subcutánea, a una dosis de 25 a 30 µg u 8 MUI a 9,6 MUI, cada dos días. Además se pueden administrar por vía intramuscular 30 µg o 6 MUI del IFN-beta una vez a la semana.***

Ejemplos

Los siguientes ejemplos no significan que la invención haya de ser interpretada limitativamente. Los siguientes ejemplos servirán para ilustrar la invención.

45 Los ejemplos muestran en una realización preferida de la invención los resultados de un método para identificar marcadores de gravedad que es: (i) abarca todo el genoma (es decir, exento de hipótesis) y (ii) no categórico (es decir, continuo). En primer lugar, se reclutaron tres cohortes de pacientes con EM ($n = 1.040$) de hospitales de Francia, Suecia e Italia, y se genotificaron alrededor de 500.000 SNP en todo el genoma con la tecnología de Affymetrix GeneChip[®] 500K. La gravedad de la EM se puntuó continuamente por el PGEM, y se evaluó la correlación con genotipos de los polimorfismos más frecuentes (~105.000 SNP) por un ensayo no paramétrico entre las distribuciones de las PGEM en pacientes homocigóticos para los alelos de cada marcador. El problema de múltiples ensayos fue controlado por estimación de la tasa de falsos descubrimientos (FDR). El método dio como resultado la identificación de 14 marcadores de gravedad, situados en 8 genes diferentes y 2 regiones desiertas. En segundo lugar, algunos marcadores fueron genotificados en una cohorte de replicación independiente de 873 pacientes con EM.

Se identificaron dos genes de enzimas de glicosilación que apoyan por tanto la importancia de la regulación de glicanos en la EM.

Materiales y métodos

Colecciones

5 Se incluyó un número total de 1.040 pacientes no relacionados de Francia, Italia y Suecia En el conjunto de datos "de cribado" y 873 pacientes no relacionados e independientes de Francia y Suecia en el conjunto de datos de "replicación" (Tabla 1). Todos los sujetos eran de raza blanca y tenían un diagnóstico de esclerosis múltiple según los criterios de McDonald²⁷ y sus cursos de la enfermedad fueron clasificados como de recaída-remisión, de progreso secundario o progreso primario²⁸. La discapacidad se puntuó utilizando la escala EEED de Kurtzke. La edad media fue 43,8 años, la puntuación media en EEED fue 3,6 y la proporción de sexos fue 2,1 mujeres/hombres. De todos los individuos se obtuvo el consentimiento informado para el análisis genético y los comités locales de ética aprobaron el protocolo del estudio.

15 Las características demográficas y clínicas detalladas de los pacientes con EM se muestran en la Tabla 2 para los conjuntos de datos del cribado y la replicación. La duración de la enfermedad se definió como el número de años entre el año de inicio del primer síntoma y el año del último examen con la determinación de la EEED, en la mayoría de los casos a la entrada en el estudio. La edad de inicio se definió como el primer episodio de disfunción neurológica que sugería la enfermedad desmielinizante.

Clasificación de la discapacidad

20 La escala EEED de Kurtzke es la medida de discapacidad más ampliamente utilizada en estudios de EM, pero no tiene en cuenta la duración de la enfermedad, un parámetro que es crítico en la descripción de la tasa de progreso. Por este motivo se utilizó la PGEM¹⁴, que proporciona una medición de la gravedad de la enfermedad en un paciente individual de forma transversal. Esta escala se refiere puntuaciones en la EEED para la distribución de la discapacidad en un amplio conjunto de datos de pacientes con duraciones comparables de la enfermedad. La PGEM se calcula utilizando el programa informático *PGEMtest* v2.0 descrito en la referencia¹⁴.

Genotipificación y control de calidad

25 Se estudiaron independientemente muestras de DNA del conjunto de datos de cribado utilizando la tecnología de cartografiado humano Affymetrix GeneChip® 500K. Se buscaron genotipos de los 497.641 SNP seleccionados por Affymetrix para cada muestra de DNA con el programa informático B-RLMM, lo que garantiza una tasa mínima de búsqueda de 97%. Solamente se mantuvieron para el análisis los SNP de los cromosomas autosómicos. Con el fin de evitar sesgos debido a muy bajas frecuencias del genotipo, se excluyeron los marcadores con baja frecuencia del alelo menos común (abreviadamente MAF por la expresión *Minor Allele Frequency*) (MAF <30%) o alta tasa de datos ausentes (proporción de DNA no tipificado > 5%). Los inventores optamos por centrarnos en los marcadores muy frecuentes (MAF > 30%), lo que garantiza una mínima frecuencia del homocigoto menos común del 9% de acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg (y luego un tamaño de población del homocigoto menos común por término medio mayor que 100).

Se genotipificaron de forma independiente muestras de DNA del conjunto de datos de replicación para los SNP seleccionados utilizando el ensayo de genotipificación de Applied Biosystems TaqMan.

Exploración de la gravedad

40 Para cada SNP, se realizó un ensayo de suma de rangos de Wilcoxon²⁹ en los dos conjuntos de puntuaciones de gravedad de EM correspondientes a pacientes homocigóticos para los alelos de cada marcador. Este ensayo no paramétrico asigna un valor de probabilidad (valor p) a cada SNP. Para el conjunto de datos de cribado, la tasa de falsos descubrimientos (FDR) se estima por permutación: (i) la nula distribución se simula permutando las puntuaciones de gravedad de la EM, volviendo a calcular los valores p de Wilcoxon, y repitiendo el proceso 10.000 veces; (ii) la FDR se calcula como sigue para cada umbral α del valor p : $FDR = \min(1, p \cdot m / R)$, donde R es el número de positivos en el nivel α (número de los SNP con una valor p más pequeño que α), m es el número de ensayos realizados (número de los SNP escaneados), y p es la probabilidad de tener una valor p menor que α bajo la hipótesis nula, según las estimaciones de la etapa previa de permutaciones^{30,31}.

Análisis genómico

50 Los SNP estaban situados en la secuencia del genoma humano NCBI v36. Las anotaciones de la estructura del gen (exones e intrones) fueron tomadas de la edición 43 de Ensembl³². Los haplotipos y las matrices de desequilibrio del DL se calcularon utilizando el programa informático HaploView³³ utilizando la espina sólida de método DL con un corte de extensión de 0,8 D' .

Resultados

De los 1.040 pacientes, la PGEM fue por término medio 4,42 (desviación típica 2,79) que abarca de 0,086 a 9,964 (véase la distribución global en la Figura 1). Aparte de los 497.641 SNP, 105.035 (21%) pasan los criterios de exclusión y se utilizan para análisis, que cubre 63% del genoma. La FDR de los resultados observados se estimó con 10.000 series de PGEM aleatorias y se representa en la Figura 2 para los 100 valores más pequeños de p . La FDR comienza alta (alrededor de 50%), aumenta rápidamente hasta una meseta de 80% y luego converge lentamente hacia 1. Cuando se considera el límite inferior del intervalo de confianza del 95%, el umbral de FDR del 40% seleccionó 14 SNP (Tabla 3). Estos SNP corresponden a genotipos frecuentes (como confirmó el filtrado inicial de MAF del 30%) y estaban todos de acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg. La selección corresponde a un límite del valor p de la gravedad de $1,4e-4$. La correlación entre los genotipos y la PGEM se ilustra en la Figura 3.

En los métodos categóricos clásicos, la escala de PGEM se divide en categorías, por ejemplo formas leves y graves de la EM, y se llevan a cabo estudios de asociación clásicos para detectar diferencias genotípicas entre estas dos categorías. Cuando se aplica a nuestro conjunto de datos, utilizando, por ejemplo, dos grupos de 501 formas leves de EM (PGEM <4) y 356 formas graves de EM (PGEM > 6), los inventores no pudimos detectar ningún SNP asociado significativo tras la corrección de ensayos múltiples por FDR³¹. Por ejemplo, el SNP rs7221818 (de rango 2 en nuestro método continuo, véase Tabla 3), fue clasificado con un rango de 67 en el método categórico (valor genotípico de $p = 6,7e-4$) y la FDR para esta selección se estimó en 80%. Sólo se recupera el SNP rs6552511 del primer rango por métodos categóricos, utilizando diferentes umbrales de la PGEM (datos no mostrados). Una vez que estos 14 SNP fueron seleccionados por el método de exploración continua, es posible, sin embargo, analizarlos en términos de los riesgos relativos categóricos clásicos y de los relaciones de posibilidades: 9 de los genotipos menos comunes están asociados con una mayor PGEM (riesgos relativos comprendidos entre 1,5 y 2,3) y 5 están asociados con una menor PGEM (los riesgos varían de 0,4 a 0,8, véanse las tablas para más detalles).

Estos SNP son cartografiados en la secuencia del genoma humano y comparados con las anotaciones de genes de ENSEMBL. Los detalles del cartografiado se presentan en la Tabla 4. Dos SNP (rs6552511 y rs7221818) están situados en las regiones desiertas (el gen más próximo está alejado más de 100 kb). Los otros 12 SNP caen dentro de 100 kb o menos de 8 genes. Algunos de estos genes (XYLT1, HIF1AN y MGAT5) están representados por varios SNP que definen bloques de gravedad del desequilibrio del ligamiento (DL) dentro de los genes. Los tres marcadores situados en 3' de HIF1AN en el cromosoma 10 se encuentran en un bloque de DL que no contiene ninguna parte de la estructura del gen HIF1AN (el bloque está a más 50 kb del codón de parada de HIF1AN) o de cualquier región reguladora conocida de HIF1AN. El SNP rs1078922 está situado a 22 kb en 5' del gen MTPN. Otros SNP están en intrones de los genes asignados: primer intrón de XYLT1 (2 SNP), segundo intrón de MGAT5 (2 SNP), octavo intrón de MEGF11, tercer intrón de FGF14, séptimo intrón de PDE9A y segundo intrón de CDH13.

Las señales en XYLT1 y MGAT5 se replicaron porque: (i) esas señales están representadas por múltiples SNP en DL, que se pueden considerar como una replicación técnica *per se* y (ii) estos dos genes codifican enzimas de glicosilación y son biológicamente candidatos interesantes (véase el apartado Estudio). Se eligieron tres SNP en los dos genes: rs12927173 en XYLT1, y rs3814022 y rs4953911 en MGAT5 (un segundo SNP, rs2059283, fue elegido en XYLT1 pero el fabricante no pudo suministrar cebadores). Los valores de p de estos 3 SNP en el conjunto de datos de replicación ($n = 873$) son, respectivamente, 0,42, $1,31e-2$ y $3,76e-3$ (Figura 4 y Tabla 5). La asociación con la gravedad de la EM se replica luego, en este conjunto de datos independiente para el SNP de MGAT5. Los valores globales de p en ambos conjuntos de datos son $2,81e-6$ y $1,54e-7$ para rs3814022 y rs4953911, respectivamente. Para el SNP en XYLT1 (rs12927173), la asociación no se reproduce en el conjunto de datos de replicación ($p = 0,42$). Sin embargo, el valor global p en ambos conjuntos de datos sigue siendo significativo ($p = 1,88e-4$).

Los inventores hemos realizado un análisis de exploración del genoma completo en más de 1.000 pacientes con EM con el fin de identificar los marcadores asociados con la gravedad de la enfermedad. El proceso global condujo a la identificación de 2 marcadores en regiones no anotadas, 3 SNP en un bloque de DL próximo al gen HIF1AN, 1 SNP en la región 5' del MTPN, y 8 marcadores dentro de otros 6 genes. Se han seleccionado y genotipificado tres marcadores en dos genes en una población de replicación independiente, lo que lleva a la confirmación de la asociación de MGAT5 con la gravedad de la enfermedad. En este caso los inventores analizamos las decisiones clínicas y metodológicas que han hecho posible estos resultados, y luego nos centramos en la importancia biológica de los genes de gravedad seleccionados y replicados.

No existe un método de consenso para medir el progreso de la EM usando las evaluaciones de discapacidad individuales transversales. La PGEM se ha desarrollado recientemente como un potente método para comparar el progreso de la enfermedad en estudios de asociación genética. Esta escala ajusta la medida ampliamente aceptada de la discapacidad, la EEED a la duración de la enfermedad comparando la discapacidad de un individuo con la distribución de las puntuaciones en los casos que tienen duración de la enfermedad equivalente. La PGEM es potencialmente superior a la EEED no lineal para evaluaciones estadísticas, puesto que combina la EEED y la duración de la enfermedad en una variable que está distribuida normalmente. En nuestras tres poblaciones, la distribución de la PGEM no es homogénea. Esto se puede explicar por la diferente composición de las poblaciones en términos de cursos de la enfermedad, y también por la conocida variabilidad entre observadores (puesto que las colecciones provienen de tres hospitales diferentes). Esta heterogeneidad en las determinaciones de la medición de la discapa-

cidad podría tener un impacto significativo en los resultados de asociación, especialmente si se utilizan umbrales arbitrarios de corte de la PGEM para definir categorías.

Estudios de gravedad publicados previamente (de genes candidatos) implementan clásicamente ensayos de asociación entre la subpoblaciones con EM leve y graves. En nuestro caso, métodos categóricos similares que utilizan diferentes umbrales de PGEM no han podido detectar un marcador asociado significativamente. Usar valores de corte en las puntuaciones de EEED (o derivados) es probablemente demasiado arbitrario e inadecuado para definir subgrupos homogéneos de gravedad, puesto que la EEED refleja sólo parcialmente (y algunas veces subjetivamente) el pronóstico de la EM. Con las puntuaciones clínicas, parecen entonces más adecuados los métodos continuos. Para la exploración, hemos optado por descartar heterocigotos y realizar ensayos U con dos muestras entre los pacientes con EM que son homocigóticos para cada SNP. Tiene dos ventajas teóricas sobre el método clásico de regresión lineal en 3 muestras. En primer lugar no se supone que los pacientes con heterocigotos tienen una gravedad intermedia de la EM (entre la gravedad de los dos grupos con homocigotos), lo que sería el caso en un modelo aditivo de riesgo de gravedad. Nuestro método permite teóricamente la detección de modos de transmisión dominantes o recesivos para los alelos de riesgo. En segundo lugar, el ensayo de suma de rangos de Wilcoxon es un ensayo no paramétrico: se aplica a distribuciones de la PGEM no gaussianas. Como contrapartida, este método es probablemente poca potente para los marcadores raros. A continuación, los inventores nos centramos en los marcadores frecuentes (MAF > 30%) para los que la frecuencia del genotipo menos común es mayor que 9% según el equilibrio de Hardy-Weinberg y está bien representada en nuestra población seleccionada ($n > 100$). Este filtrado reduce drásticamente el número de SNP analizados (hasta 105.035), mientras que mantiene una cobertura del genoma razonable (63%). Con este método se requerirían mayores tamaños de muestra para investigar marcadores menos frecuentes (por ejemplo, 2.500 individuos para 20% de marcadores, 10.000 para 10% de marcadores). *A posteriori* los inventores podemos ver que la distribución de la PGEM en toda la población no es uniforme y que, en general, las distribuciones de la PGEM por genotipos de los SNP no es gaussiana (Figura 1 y los ejemplos de SNP de la Figura 3). Por último, es importante tener en cuenta el problema de los múltiples ensayos. Con los métodos de estimación de la conservadora tasa de error por familia (como la corrección de Bonferroni), no hay SNP seleccionado, lo que significa que no somos capaces de seleccionar un conjunto de marcadores para los que estimemos que no hay falsos positivos. Hemos preferido utilizar la estimación de la FDR para controlar los múltiples ensayos, puesto que es más flexible (lo que permite una determinada proporción de falsos positivos, no necesariamente 0%) y que tiene en cuenta la dependencia entre los marcadores³¹.

El método controlado por la FDR dio como resultado la selección de 14 marcadores. Los dos primeros SNP del rango muestran importantes diferencias en las frecuencias del genotipo menos común entre resultados clínicos leves (PGEM <2) y graves (PGEM > 8) (los riesgos relativos son alrededor de 2,2) y son por tanto marcadores de interés para la gravedad de la EM. Sin embargo, están situados en la región genómica no anotada y por lo tanto es imposible plantear hipótesis sobre su impacto funcional en el pronóstico de la enfermedad. Otros SNP están dentro o próximos a los genes anotados. Entre ellos, el MGAT5 es de particular interés biológico. El gen MGAT5 (también conocido como GNT-V) codifica la beta-1,6-*N*-acetil-glucosaminiltransferasa, una enzima implicada en la síntesis de beta-1,6-GlcNAc-*N*-glicanos ramificados unidos a la superficie celular y a las glicoproteínas secretadas. En ratones, la deficiencia de MGAT5 tiene un papel protector en el crecimiento de tumores³⁴ y está asociada con una mayor sensibilidad a la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) en comparación con la de tipo natural³⁵. La deficiencia de MGAT5 aumenta el número de receptores de linfocitos T reclutados en la superficie de presentación de antígenos, reduciendo así el requisito de la implicación del co-receptor CD28. CD28 y MGAT5 actúa contrariamente a los reguladores de los umbrales de activación de los linfocitos T y a la sensibilidad a enfermedades inmunitarias. La asociación de CD28 con la gravedad de la EM ya había sido analizada y se sabe que no era significativa²¹. Por otra parte, la expresión de beta-1,6-GlcNAc-*N*-glicanos ramificados inhibe selectivamente la diferenciación de linfocitos Th1 y aumenta la polarización de linfocitos Th2³⁶. También se ha observado una deficiente glicosilación en linfocitos de pacientes con EM: una disminución de 25-30% la actividad de la GCNT1 (otra glucosaminiltransferasa) está correlacionada con la aparición de fases clínicas agudas de la esclerosis múltiple y la presencia de lesiones activas en la recaída-remisión³⁷. Por tanto, los inventores apoyamos en la presente invención la asociación de MGAT5 y más generalmente de los GlcNAc-*N*-glicanos ramificados con el pronóstico de la EM. Al igual que MGAT5, la XYLT1 (xilosiltransferasa I, XT-I) es una enzima implicada en la glicosilación. La XYLT1 es la enzima iniciadora de cadena implicada en la biosíntesis de proteoglicanos que contienen glicosaminoglicanos (GAG). Los proteoglicanos, un grupo grande de glicoproteínas, son de dos tipos principales, sulfato de condroitina (CSPG) y sulfato de heparina (HSPG). La mayoría de los CSPG son secretados por células y participan en la formación de la matriz extracelular (MEC). Los CSPG son el tipo más abundante de proteoglicanos expresados en el SNC de mamíferos y actúan principalmente como moléculas barrera que afectan al crecimiento axonal, la migración celular y la plasticidad, en particular a través de sus cadenas de GAG. Una lesión en el SNC de un adulto provoca la formación de una cicatriz glial, que consiste en la proliferación y migración de células gliales (principalmente, astrocitos reactivos, microglía y precursores de oligodendrocitos) que sobre-regulan varias moléculas de la MEC, incluyendo los CSPG. Los proteoglicanos de la cicatriz glial podrían jugar un papel protector, pero la cicatriz glial y sus CSPG asociados son uno de los principales impedimentos para la regeneración de los axones de las neuronas lesionadas del SNC³⁸. En la EM, se ha descrito la alteración de las moléculas de la MEC y se ha demostrado la producción y deposición excesivas de los constituyentes de la membrana basal en las lesiones de la EM activas y pueden contribuir a la pérdida axonal³⁹. Por lo tanto, debido a que XYLT1 inicia la prolongación de la cadena de GAG y la síntesis de los CSPG, dos equipos han desarrollado una enzima de DNA que tienen como diana el mRNA de esta enzima y muestran una

reducción de los CSPG^{40,41}. Además de esta vinculación con la EM, la XYLT1 ha mostrado un aumento de actividad en el suero de pacientes con esclerosis sistémica que se correlaciona con la clasificación clínica⁴². Otros genes asignados a los marcadores de gravedad seleccionados son: HIF1AN (inhibidor del Factor 1 alfa inducible por hipoxia), MEGF11 (múltiples dominios similares a EGF 11), FGF14 (factor de crecimiento de fibroblastos 14), PDE9A (fosfodiesterasa 9A), MTPN (miotrofina) y CDH13 (cadherina 13). No se ha encontrado ningún marcador significativo en las regiones previamente descritas asociadas con la gravedad de la EM²³⁻²⁶.

Debido a que MGAT5 y XYLT1 son candidatos biológicamente relevantes que comparten funciones de glicosilación similares, los inventores decidimos replicar el experimento en una población independiente. Como resultado, en el conjunto de datos de replicación se confirmaron claramente dos SNP en MGAT5 y no se encontró asociado un SNP en XYLT1.

En conclusión, la primera exploración de gravedad de la EM en todo el genoma que hemos realizado ha llevado a la identificación libre de suposiciones de marcadores asociados al pronóstico de la enfermedad. La comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen al progreso de la enfermedad es un punto crucial que debe ser abordado de forma paralela a la búsqueda de factores de sensibilidad. Dos de los principales genes identificados, MGAT5 y XYLT1, están implicados en los procesos de glicosilación, confirmando así la importancia de la regulación de los glicanos en la EM. Entre estos dos, el MGAT5 fue confirmado en un conjunto de datos de replicación independiente, mientras que la replicación de XYLT1 condujo en nuestro estudio a resultados más contradictorios. Los glicanos desempeñan un papel fundamental en la modulación de las interacciones moleculares en el contexto de múltiples sistemas fisiológicos, incluyendo la defensa inmunitaria, y se ha demostrado que la glicosilación tiene un papel crítico en la regulación global de la respuesta inmunitaria^{43,44}. La glicosilación de proteínas es importante desde el punto de vista del mecanismo de la patogénesis de las enfermedades autoinmunitarias: varias pruebas apoyan el "modelo de autoinmunidad generado por epítopos remanentes" (abreviadamente modelo REGA por la expresión inglesa *Remnant Epitopes Generate Autoimmunity*) en la EM, la artritis reumatoide (AR) y la diabetes⁴⁵. Según este modelo, el proceso autoinmunitario implica citoquinas, quimioquinas y proteinasas que escinden glicoproteínas en epítopos remanentes que son presentados a los linfocitos T autorreactivos, manteniendo la reacción autoinmunitaria. Ejemplos de sustratos que proporcionan dichos epítopos remanentes incluyen la proteína básica mielina, α B-cristalina y el interferón- β en la EM, y el colágeno de tipo II en la AR⁴⁶. El modelo REGA ha sido analizado *in vivo* con el uso de un modelo animal y podría tener implicaciones terapéuticas interesantes, puesto que la inhibición de proteinasas, tales como gelatinasa B para EM o AR, da como resultado efectos beneficiosos^{47,48}.

30 Tablas

Tabla 1. Colecciones de esclerosis múltiples

Conjunto de datos	Origen	Nº de individuos	RR (%)	PS (%)	PP (%)
Población de cribado	Rennes (Francia)	384	172 (45%)	135 (35%)	77 (20%)
	Huddinge (Suecia)	299	194 (65%)	83 (28%)	22 (7%)
	San Raffaele (Italia)	357	228 (64%)	94 (26%)	35 (10%)
	Total	1.040	594 (57%)	312 (30%)	134 (13%)
Población de replicación	Rennes (Francia)	184	110 (60%)	44 (24%)	30 (16%)
	Huddinge (Suecia)	689	277 (40%)	348 (51%)	61 (9%)
	Total	873	387 (44%)	392 (45%)	91 (10%)
Total global		1.913	981 (51%)	704 (37%)	225 (12%)

Tabla 2. Características demográficas y clínicas medias de los pacientes con EM en los conjuntos de datos de cribado y replicación

Población de cribado	EM (n = 1040)	RR (n = 594)	PS (n = 312)	PP (n = 134)
Mujer/hombre	704/336	427/167	201/111	76/58
Edad (años)	43,2	38,9	48,4	50,2
Duración de la enfermedad (años)	12,3	9,3	18,4	11,4
Edad de inicio de la enfermedad (años)	30,9	29,6	30,0	38,8
EEED	3,6	2,0	5,4	5,3
Población de replicación	EM (n = 879)	RR (n = 387)	PS (n = 392)	PP (n = 91)
Mujer/hombre	631/242	298/89	248/144	52/39
Edad (años)	52,5	45,8	57,9	57,9
Duración de la enfermedad (años)	20,4	14,9	26,1	18,9
Edad de inicio de la enfermedad (años)	32,1	30,9	31,8	39,0
EEED	4,5	2,6	6,0	5,3

5 **Tabla 3.** SNP seleccionados en el umbral del límite inferior del 40% de la FDR

Identidad del SNP	Ran-go	Homocigoto 1			Heterocigoto			Homocigoto 2			Gravedad			
			<i>n</i>	<i>m</i>	<i>sd</i>		<i>n</i>	<i>m</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>		<i>m</i>	<i>sd</i>	Valor <i>p</i>
rs6552511	1	TT	435	4,03	2,69	CT	457	4,54	2,80	CC	129	5,35	2,77	5,11E-06
rs7221818	2	TT	429	4,10	2,73	CT	475	4,51	2,82	CC	128	5,29	2,73	2,78E-05
rs12927173	3	AA	267	4,96	2,70	AG	524	4,37	2,81	GG	246	3,94	2,75	3,06E-05
rs2059283	4	AA	267	4,94	2,69	AC	526	4,39	2,82	CC	246	3,94	2,75	3,61E-05
rs1343522	5	AA	320	4,01	2,71	AG	518	4,43	2,73	GG	198	5,08	2,93	3,91E-05
rs4953911	6	TT	423	4,70	2,85	AT	452	4,42	2,72	AA	140	3,60	2,70	4,58E-05
rs4573623	7	AA	298	4,06	2,75	AG	504	4,37	2,74	GG	214	5,08	2,86	5,68E-05
rs333548	8	CC	481	4,25	2,78	CT	443	4,36	2,76	TT	114	5,39	2,80	1,03E-04
rs10508075	9	GG	288	4,73	2,85	AG	538	4,55	2,79	AA	206	3,74	2,63	1,05E-04
rs2839580	10	AA	363	4,78	2,86	AC	513	4,39	2,74	CC	156	3,73	2,66	1,08E-04
rs2495725	11	GG	304	3,99	2,69	AG	510	4,44	2,74	AA	200	5,05	2,95	1,16E-04
rs3814022	12	GG	491	4,65	2,82	CG	434	4,39	2,74	CC	107	3,53	2,68	1,20E-04
rs1078922	13	AA	352	4,09	2,68	AG	470	4,40	2,82	GG	192	5,03	2,81	1,28E-04
rs4315313	14	CC	426	4,70	2,83	CT	457	4,41	2,75	TT	127	3,60	2,72	1,30E-04

n: Número de individuos que tienen este genotipo; *m* y *sd*: valor medio y desviación típica de la PGEM para estas personas. El valor *p* se refiere al ensayo de suma de rangos realizado en categorías homocigóticas (no se usan heterocigotos, véase el texto).

Tabla 4. Situación en el genoma de los SNP de gravedad seleccionados.

Identidad del SNP	Rango	Cromosoma	Posiciones	MAF	Gen más próximo
rs6552511	1	4q34	182,688,603	35%	(Desierto)
rs7221818	2	17p13	5,742,055	35%	(Desierto)
rs12927173	3	16p13.1	17,378,835	49%	XYLT1 (Intrón)
rs2059283	4	16p13.1	17,377,011	49%	XYLT1 (Intrón)
rs1343522	5	10q24	102,358,165	44%	58kb en 3' de HIF1AN
rs4953911	6	2q21	134,785,280	36%	MGAT5 (Intrón)
rs4573623	7	10q24	102,361,387	46%	61kb en 3' del HIF1AN
rs333548	8	15q22	64,032,567	32%	MEGF11 (Intrón)
rs10508075	9	13q32	101,237,200	46%	FGF14 (Intrón)
rs2839580	10	21q22	43,030,176	40%	PDE9A (Intrón)
rs2495725	11	10q24	102,354,010	45%	54kb en 3' de HIF1AN
rs3814022	12	2q21	134,764405	31%	MGAT5 (Intrón)
rs1078922	13	7q33	135,334,939	42%	22kb en 5' de MTPN
rs4315313	14	16q23	81,644,234	35%	CDH13 (Intrón)

Tabla 5. Replicación de los marcadores de gravedad en muestras independientes

5

SNP	Conjunto de datos	Homocigoto más común			Heterocigoto			Homocigoto menos común			Valor p
		Nº de muestras	Valor medio de la PGEM	Desviación típica de la PGEM	Nº de muestras	Valor medio de la PGEM	Desviación típica de la PGEM	Nº de muestras	Desviación típica de la PGEM	Desviación típica de la PGEM	
rs3814022	Cribado	491	4,65	2,82	434	4,39	2,74	107	3,53	2,68	1,20E-04
	Replicación	491	4,99	2,99	310	4,66	2,99	64	3,97	2,72	1,31E-02
	Total	982	4,82	2,91	744	4,50	2,84	171	3,69	2,70	2,81E-06
rs4953911	Cribado	423	4,70	2,85	452	4,42	2,72	140	3,60	2,70	4,58E-05
	Replicación	449	5,06	2,99	317	4,69	2,99	75	3,95	2,77	3,76E-03
	Total	872	4,88	2,93	769	4,53	2,84	215	3,72	2,72	1,54E-07
rs12927173	Cribado	267	4,96	2,70	524	4,37	2,81	246	3,94	2,75	3,06E-05
	Replicación	249	5,01	2,95	425	4,66	3,07	171	4,80	2,83	0,42
	Total	516	4,98	2,82	949	4,50	2,93	417	4,29	2,81	1,88E-04

Referencias

1. Dymment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2004; 3:104-110
2. Hafler DA, Compston A, Sawcer S et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med.* 2007; 357
- 5 3. Lincoln MR, Montpetit A, Cader MZ et al. A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2005; 37:1108-1112
4. Compston A, Sawcer S. Genetic analysis of multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2002; 2:259-266
5. Fogdell-Hahn A, Ligiers A, Gronning M et al. Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease. *Tissue Antigens.* 2000; 55:140-148
- 10 6. Harbo HF, Lie BA, Sawcer S et al. Genes in the HLA class I region may contribute to the HLA class II-associated genetic susceptibility to multiple sclerosis. *Tissue Antigens.* 2004; 63:237-247
7. Yeo TW, De Jager PL, Gregory SG et al. A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2007; 61:228-236
- 15 8. Gregory SG, Schmidt S, Seth P et al. Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2007;
9. Zhang Z, Duvefelt K, Svensson F et al. Two genes encoding immune-regulatory molecules (LAG3 and IL7R) confer susceptibility to multiple sclerosis. *Genes Immun.* 2005; 6:145-152
10. Lundmark F, Duvefelt K, Hillert J. Genetic association analysis of the interleukin 7 gene (IL7) in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2007; 192:171-173
- 20 11. Hensiek AE, Seaman SR, Barcellos LF et al. Familial effects on the clinical course of multiple sclerosis. *Neurology.* 2007; 68:376-383
12. Rasmussen HB, Clausen J. Genetic risk factors in multiple sclerosis and approaches to their identification. *J Neurovirol.* 2000; 6 Suppl 2:S23-S27
- 25 13. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EEED). *Neurology.* 1983; 33:1444-1452
14. Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T et al. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology.* 2005; 64:1144-1151
15. Kantarci OH, de AM, Weinshenker BG. Identifying disease modifying genes in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2002; 123:144-159
- 30 16. Burwick RM, Ramsay PP, Haines JL et al. APOE epsilon variation in multiple sclerosis susceptibility and disease severity: some answers. *Neurology.* 2006; 66:1373-1383
17. Santos M, do Carmo CM, Edite RM et al. Genotypes at the APOE and SCA2 loci do not predict the course of multiple sclerosis in patients of Portuguese origin. *Mult Scler.* 2004; 10:153-157
- 35 18. Lindquist S, Schott BH, Ban M et al. The BDNF-Val66Met polymorphism: implications for susceptibility to multiple sclerosis and severity of disease. *J Neuroimmunol.* 2005; 167:183-185
19. Kroner A, Vogel F, Kolb-Maurer A et al. Impact of the Asp299Gly polymorphism in the toll-like receptor 4 (tlr-4) gene on disease course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2005; 165:161-165
20. Hensiek AE, Roxburgh R, Meranian M et al. Osteopontin gene and clinical severity of multiple sclerosis. *J Neurol.* 2003; 250:943-947
- 40 21. van VT, Crusius JB, van WL et al. CTLA-4 and CD28 gene polymorphisms in susceptibility, clinical course and progression of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2003; 140:188-193
22. Schreiber K, Otura AB, Ryder LP et al. Disease severity in Danish multiple sclerosis patients evaluated by MRI and three genetic markers (HLA-DRB1*1501, CCR5 deletion mutation, apolipoprotein E). *Mult Scler.* 2002; 8:295-298
- 45 23. Mann CL, Davies MB, Stevenson VL et al. Interleukin 1 genotypes in multiple sclerosis and relationship to disease severity. *J Neuroimmunol.* 2002; 129:197-204

24. Almeras L, Meresse B, Seze J et al. Interleukin-10 promoter polymorphism in multiple sclerosis: association with disease progression. *Eur Cytokine Netw.* 2002; 13:200-206
25. Goertsches R, Comabella M, Navarro A et al. Genetic association between polymorphisms in the ADAMTS14 gene and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2005; 164:140-147
- 5 26. Mead RJ, Neal JW, Griffiths MR et al. Deficiency of the complement regulator CD59a enhances disease severity, demyelination and axonal injury in murine acute experimental allergic encephalomyelitis. *Lab Invest.* 2004; 84:21-28
27. McDonald WI, Compston A, Edan G et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2001; 50:121-127
- 10 28. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology.* 1996; 46:907-911
29. Wilcoxon F. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics.* 1945; 1:80-83
30. Storey JD, Tibshirani R. Statistical significance for genomewide studies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100:9440-9445
- 15 31. Forner, K., Lamarine, M., Guedj, M., Dauvillier, J., and Wojcik, J. Universal false discovery rate estimation methodology for genome-wide association studies. *Human Heredity* 2007. Ref Type: In Press
32. Birney E. Ensembl 2007. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35:610-617
33. Barrett JC, Fry B, Maller J et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005; 21:263-265
- 20 34. Granovsky M, Fata J, Pawling J et al. Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice. *Nat Med.* 2000; 6:306-312
35. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S et al. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature.* 2001; 409:733-739
- 25 36. Morgan R, Gao G, Pawling J et al. N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5)-mediated N-glycosylation negatively regulates Th1 cytokine production by T cells. *J Immunol.* 2004; 173:7200-7208
37. Orlacchio A, Sarchielli P, Gallai V et al. Activity levels of a beta1,6 N-acetylglucosaminyltransferase in lymphomonocytes from multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci.* 1997; 151:177-183
38. Carulli D, Laabs T, Geller HM et al. Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 2005; 15:116-120
- 30 39. van HJ, Bo L, Dijkstra CD et al. Extensive extracellular matrix depositions in active multiple sclerosis lesions. *Neurobiol Dis.* 2006; 24:484-491
40. Grimpe B, Silver J. A novel DNA enzyme reduces glycosaminoglycan chains in the glial scar and allows microtransplanted dorsal root ganglia axons to regenerate beyond lesions in the spinal cord. *J Neurosci.* 2004; 24:1393-1397
- 35 41. Grimpe B, Pressman Y, Lupa MD et al. The role of proteoglycans in Schwann cell/astrocyte interactions and in regeneration failure at PNS/CNS interfaces. *Mol Cell Neurosci.* 2005; 28:18-29
42. Gotting C, Sollberg S, Kuhn J et al. Serum xylosyltransferase: a new biochemical marker of the sclerotic process in systemic sclerosis. *J Invest Dermatol.* 1999; 112:919-924
- 40 43. Garcia GG, Berger SB, Sadighi Akha AA et al. Age-associated changes in glycosylation of CD43 and CD45 on mouse CD4 T cells. *Eur J Immunol.* 2005; 35:622-631
44. Grabie N, Delfs MW, Lim YC et al. Beta-galactoside alpha2,3-sialyltransferase-I gene expression during Th2 but not Th1 differentiation: implications for core2-glycan formation on cell surface proteins. *Eur J Immunol.* 2002; 32:2766-2772
- 45 45. Descamps FJ, Van den Steen PE, Nelissen I et al. Remnant epitopes generate autoimmunity: from rheumatoid arthritis and multiple sclerosis to diabetes. *Adv Exp Med Biol.* 2003; 535:69-77
46. Opendakker G, Dillen C, Fiten P et al. Remnant epitopes, autoimmunity and glycosylation. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1760:610-615

47. Dubois B, Masure S, Hurtenbach U et al. Resistance of young gelatinase B-deficient mice to experimental autoimmune encephalomyelitis and necrotizing tail lesions. *J Clin Invest.* 1999; 104:1507-1515
48. Itoh T, Matsuda H, Tanioka M et al. The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J Immunol.* 2002; 169:2643-2647
- 5 49. Kurzke J.F., *Neuroepidemiology*, 1991, 10: 1 - 8
50. Kurzke J.F., *Neurology*, 1983, 33: 1444 - 1452
51. McDonald W.I et al., *Ann. Neurol.*, 2001, 50: 121 - 127
52. Polman C.H. et al., *Ann. Neurol.* 2005, 58: 840 - 846

Listado de secuencias

- <110> Merck Serono S.A.
- <120> Marcadores genéticos de la gravedad de la esclerosis múltiple
- <130> P 09/042 WO/PCT
- 5 <150> EP 09156487.2
<151> 2009-03-27

<150> US 61/165,141
<151> 2009-03-31

<160> 14
- 10 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens
- 15 <220>
<221> variación
<222> (17)..(17)
<223> y e s c o t

<400> 1
- 20 cattgcaact catctayacc tgtaactctt gtt 33

<210> 2
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens
- 25 <220>
<221> variación
<222> (17)..(17)
<223> y e s c o t

<400> 2
- 30 tagccgtgtgtgtccayctc ctccaataga atg 33

<210> 3
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens
- 35 <220>
<221> variación
<222> (17)..(17)
<223> r e s a o g

<400> 3
- 40 ggctggctgt cccgccraac aaagagcctg gat 33

<210> 4
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens
- 45 <220>
<221> variación
<222> (17)..(17)
<223> m e s a o c

<400> 4
- 50 ttgaccagcc ttatcamatc tgactgtatt tcc 33

<210> 5
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <221> varitation
 <222> (17)..(17)
 <223> r e s g o a

<400> 5
 10 cccaaagatg ccggacrgat accccaagag gtg 33

<210> 6
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

15 <220>
 <221> variación
 <222> (17)..(17)
 <223> w e s t o a

<400> 6
 20 gtttataaaa actctcwgaa acctcaaaga aca 33

<210> 7
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

25 <220>
 <221> variación
 <222> (17)..(17)
 <223> r e s g o a

<400> 7
 30 gaatcagggtt ctgatcraga tccacaaatt tta 33

<210> 8
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

35 <220>
 <221> variación
 <222> (17)..(17)
 <223> y e s t o c

<400> 8
 40 gcaattaccg gtaagcyatg agagtagtgg ggg 33

<210> 9
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

45 <220>
 <221> variación
 <222> (17)..(17)
 <223> r e s g o a

<400> 9
 50 tgttgctgac aattaarcca catagcattt ata 33

<210> 10
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> variación
 <222> (17)..(17)
 <223> m e s a o c

5 <400> 10
 ttgcatcttt gggttamggc tctgctgccc ttg 33

<210> 11
 <211> 33
 <212> DNA

10 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> variación
 <222> (17)..(17)
 <223> r e s a o g

15 <400> 11
 agtccctaag tgccacraat gaaaagaaga ctc 33

<210> 12
 <211> 33
 <212> DNA

20 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> variación
 <222> (17)..(17)
 <223> s e s g o c

25 <400> 12
 ttttaattccc cacaasagc tgagtggtc ttg 33

<210> 13
 <211> 33
 <212> DNA

30 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> variación
 <222> (17)..(17)
 <223> r e s g o a

35 <400> 13
 ggaaaacaaa tttccrctt ctaaggctgt taa 33

<210> 14
 <211> 33
 <212> DNA

40 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> variación
 <222> (17)..(17)
 <223> y e s c o t

45 <400> 14
 tgaatgagat aattcaygtg aggctcttag aaa 33

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir la gravedad de la enfermedad esclerosis múltiple en un individuo, que comprende las etapas de:
 - a. usar un ácido nucleico aislado de una muestra de un individuo;
 - 5 b. determinar el tipo de nucleótido en el SNP rs2059283 y/o rs12927173, en uno o ambos alelos del marcador dialélico; y
 - c. correlacionar el resultado de las etapas de genotipificación con la gravedad de la enfermedad esclerosis múltiple.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la identidad de los nucleótidos en dicho marcadores dialélicos se determina para ambas copias de dicho marcadores dialélicos presentes en dicho genoma del individuo.
- 10 3. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha determinación se realiza por un ensayo de microsecuenciación.
4. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además amplificar una porción de una secuencia que comprende el marcador dialélico antes de dicha etapa de determinación.
5. Método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha amplificación se realiza por PCR.
- 15 6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la presencia de una A en rs2059283 y/o una A en rs12927173 indica que la enfermedad de la esclerosis múltiple es grave en dicho individuo.
7. Interferón-beta para uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple en un paciente que tiene el alelo A en rs2059283 y/o una A en rs12927173, en el que el tratamiento comprende la determinación in vitro de si el paciente tiene o no tiene dichos alelos.
- 20 8. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el interferón-beta es interferón-beta 1a o 1b.
9. El método o uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el interferón-beta es Rebif®, Avonex®, Cinnovex®, Betaseron® o Extavia®.

Figura 1

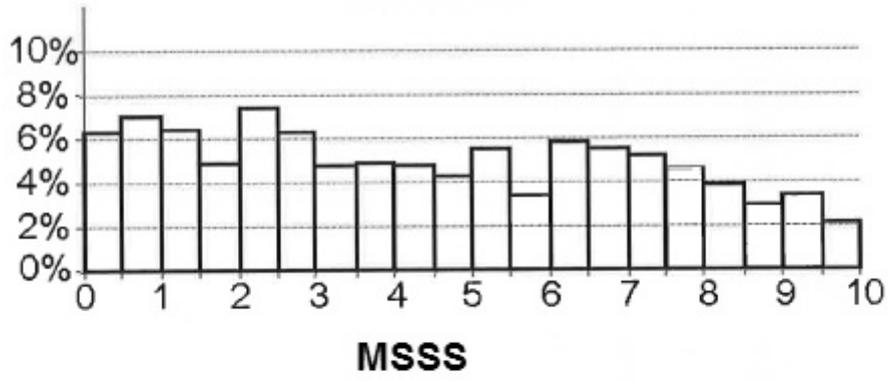


Figura 2

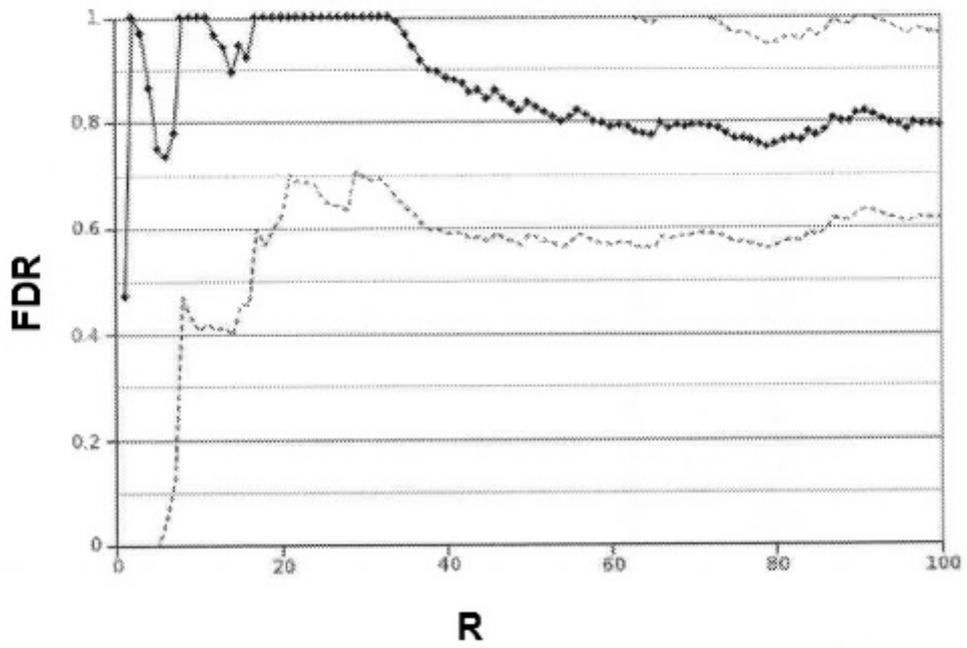


Figura 3

Figura 3.1

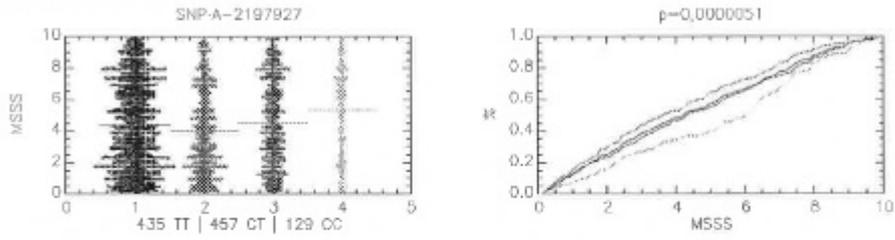


Figura 3.2

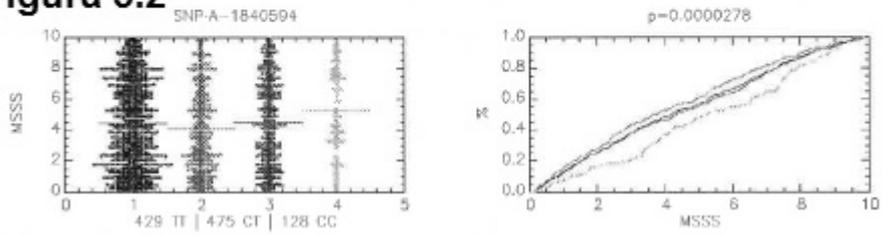


Figura 3.3

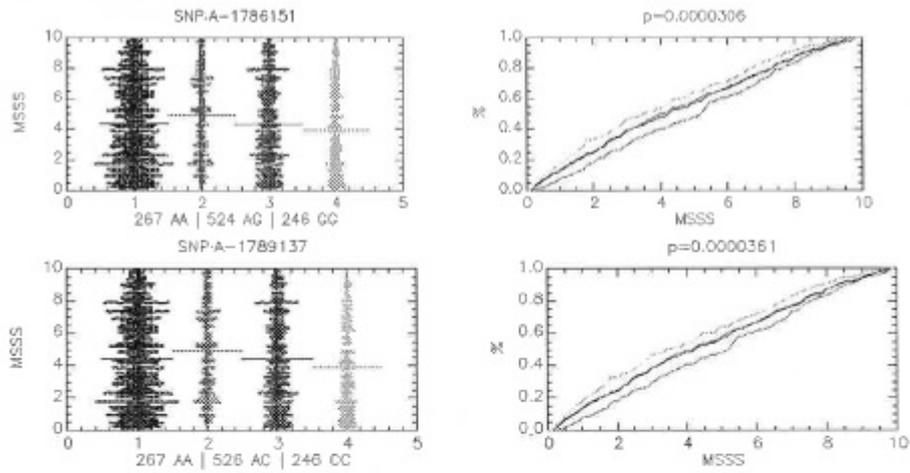


Figura 3.4

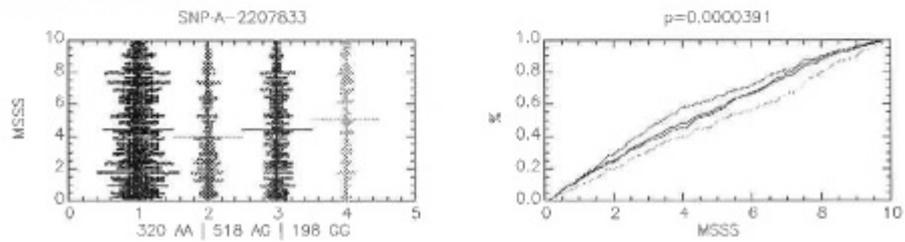


Figura 3 (continuación 1)

Figura 3.4 (continuación)

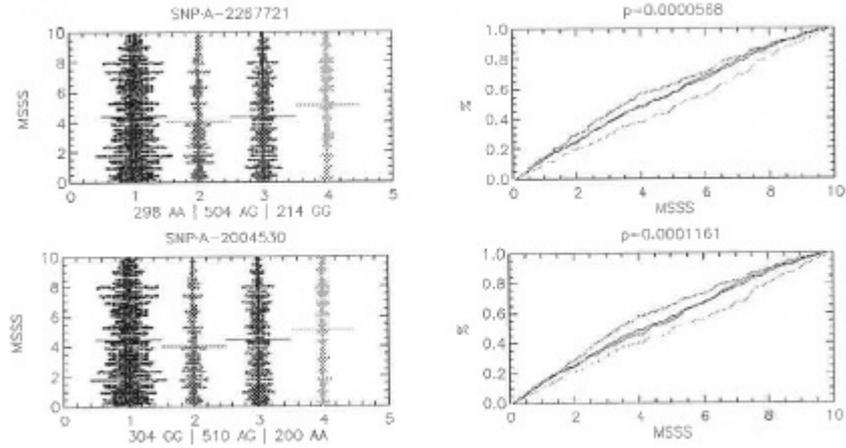


Figura 3.5

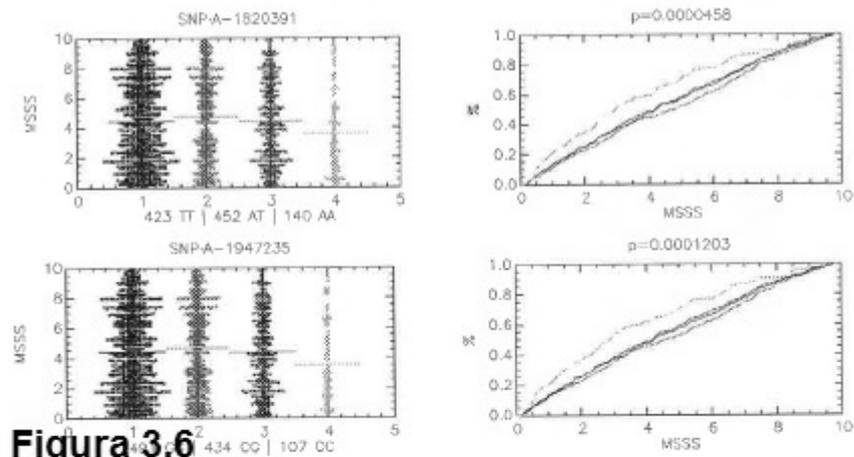


Figura 3.6

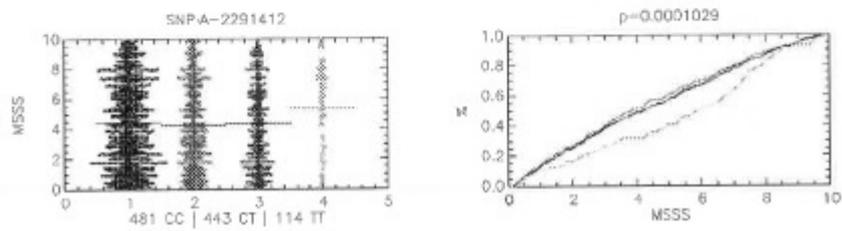


Figura 3 (continuación 2)

Figura 3.7

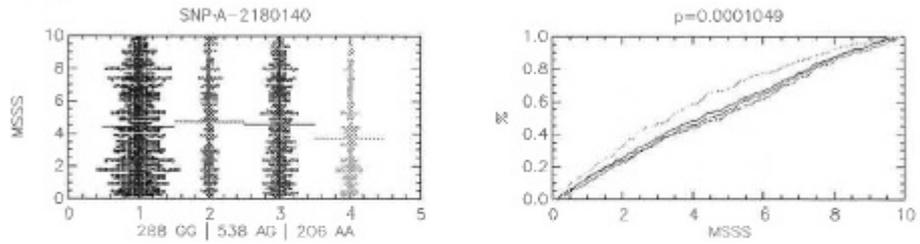


Figura 3.8

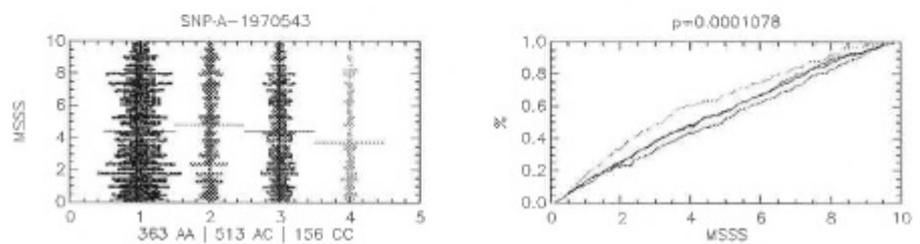


Figura 3.9

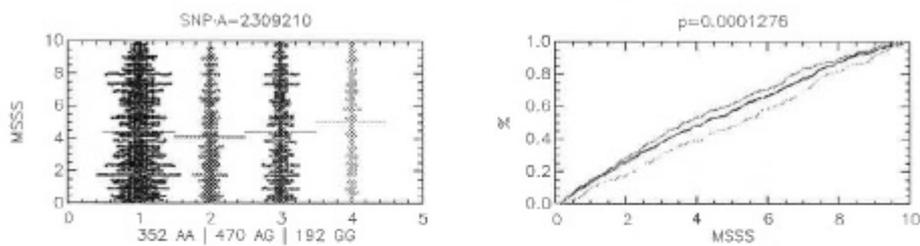


Figura 3.10

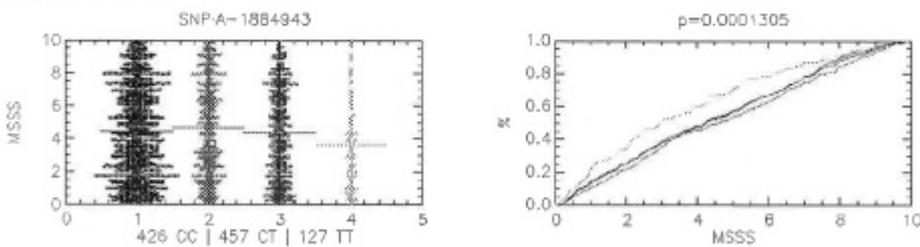


Figura 4

