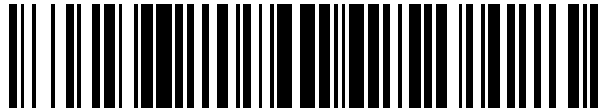


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 774**

51 Int. Cl.:

G01N 33/48 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2009 E 09810643 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2329259**

54 Título: **Marcadores y métodos de evaluación y tratamiento de colitis ulcerosa y trastornos relacionados mediante un panel de 20 genes**

30 Prioridad:

29.08.2008 US 92966 P

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

07.09.2016

73 Titular/es:

**JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US**

72 Inventor/es:

**LI, XILIN y
BARIBAUD, FREDERIC**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 581 774 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 y métodos de evaluación y tratamiento de colitis ulcerosa y trastornos relacionados mediante un panel de 20 genes

La invención se refiere a la identificación de perfiles de expresión y los ácidos nucleicos indicativos de trastornos relacionados gastrointestinales, tales como colitis ulcerosa, y para el uso de tales perfiles de expresión y ácidos nucleicos en el diagnóstico de la colitis ulcerosa y enfermedades relacionadas. La invención se refiere además a métodos para identificar, utilizar y probar agentes candidatos y/u objetivos que modulan la colitis ulcerosa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad autoinmune multifactorial con una patogénesis compleja que implica factores no identificados genéticos, microbianos, y ambientales. Estudios recientes utilizando el análisis de micromatriz de biopsia de tejido colonoscópico inflamado frente a las muestras de biopsias no inflamadas de pacientes con CU revelaron desregulación de unas citoquinas inflamatorias, sin embargo, la etiología, patogenia, y el papel del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en CU aún es poco conocido. TNF α es una citocina proinflamatoria crítica en la enfermedad de Crohn como se demuestra por el efecto terapéutico de infliximab en la inducción y el mantenimiento de la remisión clínica, el cierre de fístulas enterocutáneas, perianales, y rectovaginales, el mantenimiento del cierre de la fístula, y esteroides se estrecha en pacientes con enfermedad de Crohn. Sin embargo, la evidencia para apoyar un papel de TNF α en la patogénesis de la UC ha sido motivo de controversia a pesar del hecho de que también se encuentra en niveles elevados en la sangre, el tejido del colon, y heces fecales de pacientes con CU. Un estudio clínico (ACT-1) por Rutgeerts et al. mostró que infliximab es eficaz cuando se administra en las semanas 0, 2, 6 y cada 8 semanas en el logro de la respuesta clínica y la remisión en pacientes con CU activa moderada a severa a pesar de la utilización de la terapia convencional que apoye un papel patogénico fundamental de TNF α en la CU.

La tecnología de micromatriz es una herramienta poderosa, ya que permite el análisis de la expresión de miles de genes simultáneamente, y también puede ser automatizado para permitir un formato de alto rendimiento. En las enfermedades asociadas con las funciones de acogida complejas, tales como las conocidas enfermedades inflamatorias inmunes mediadas, tales como CU, resultados de micromatriz pueden proporcionar un perfil de expresión de genes que pueden ser de utilidad en el diseño de nuevos enfoques para el diagnóstico y manejo de la enfermedad. Estos enfoques también sirven para identificar nuevos genes y anotar genes de función desconocida hasta ahora no asociados con la enfermedad o condición. En consecuencia, hay una necesidad de identificar y caracterizar nuevos marcadores de genes útiles en el desarrollo de métodos para el diagnóstico y el tratamiento de trastornos autoinmunes, tales como CU y enfermedad de Crohn, así como otras enfermedades y condiciones, y cómo un paciente respondería a una intervención terapéutica.

La expresión génica se puede modular de diferentes maneras, incluyendo mediante el uso de SiARNs, shARNs, moléculas antisentido y ADNzimas. SiARNs y shARNs trabajan a través de la vía de ARNi y se han utilizado con éxito para suprimir la expresión de genes. ARNi fue descubierto por primera vez en gusanos y el fenómeno de silenciamiento de genes relacionados con dsARN se informó por primera vez en las plantas por Fire y Mello y se cree que es una manera para que las células vegetales combaten la infección por el virus de ARN. En esta vía, el producto viral largo dsARN se procesa en fragmentos más pequeños de 21 a 25 pb de longitud por un DICER como enzima y, a continuación la molécula de doble cadena se desenrolla y se carga en el silenciamiento de ARN inducida complejo (RISC). Una vía similar ha sido identificada en células de mamífero con la notable diferencia que las moléculas de ARN de doble cadena debe ser menor que 30 pb de longitud con el fin de evitar la inducción de la denominada respuesta de interferón, que no es de genes específicos y conduce a la desconexión mundial de síntesis de proteínas en la célula

SiARNs sintéticos se han diseñado con éxito para atacar selectivamente un solo gen y pueden ser entregados a las células in vitro o in vivo. ShARNs son los equivalentes de ADN de moléculas de ARNs i y tienen la ventaja de ser incorporadas en el genoma de las células donde se replican durante cada ciclo mitótico.

ADNzimas también se han usado para modular la expresión génica. ADNzimas son moléculas de ADN catalíticos que escinden ARN monocatenario. Son altamente selectivos para la secuencia de ARN diana y, como tal, se pueden utilizar para regular por disminución genes específicos a través de la orientación de ARN mensajero.

US2004/077020 describe un método para la matriz de compuestos terapéuticos mediante la detección de cambios en los niveles de expresión de diferentes genes. WO2008/028044 se refiere a un método de prueba de terapias para eficacia utilizando un panel de genes de 66 miembros. WO2007/103823 describe un método para la predicción de una terapia adecuada para los pacientes que sufren de cáncer gastrointestinal mediante la determinación de la expresión de ciertos genes marcadores.

En consecuencia, hay una necesidad de identificar y caracterizar nuevos marcadores de genes útiles en el desarrollo de métodos para el diagnóstico y el tratamiento de trastornos autoinmunes, tales como CU y la enfermedad de Crohn, así como otras enfermedades y condiciones.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención proporciona un método para predecir la idoneidad de un tratamiento con una terapia de destino para un trastorno relacionado gastrointestinal en un sujeto, en el que el sujeto es un paciente que proporciona la muestra antes de la administración de la terapia, y en el que la terapia es un anticuerpo anti-TNF α , que comprende:

- a) preparación de una muestra de ácidos nucleicos a partir de una muestra obtenida del sujeto;
- b) poner en contacto la muestra con un panel de segmentos de ácido nucleico que consiste en SEQ ID NOS: 1-20 para detectar niveles de los segmentos de panel;
- c) la evaluación de la muestra frente a un patrón de referencia de una respuesta a la terapia para determinar los niveles relativos de expresión de todos los miembros del grupo que consta de las secuencias de nucleótidos correspondientes a SEQ ID NOS: 1-20 en comparación con el estándar de referencia; y
- d) correlacionar los niveles de expresión relativos de la muestra y el estándar de referencia con la idoneidad del tratamiento con la terapia de destino para el trastorno relacionado gastrointestinal.

La invención también proporciona un reactivo para la matriz de la idoneidad de un anticuerpo anti-TNF α para un trastorno relacionado gastrointestinal en una célula o sujeto antes de la administración del anticuerpo anti-TNF α , que comprende oligonucleótidos que comprenden al menos 15 nucleótidos que comprenden o complementan a una secuencia de nucleótidos de cada de las secuencias de nucleótidos correspondientes a SEQ ID NOS: 1-20, un polipéptido codificado por al menos una parte de cada una de las secuencias de nucleótidos correspondientes a SEQ ID NOS: 1-20, y un ligando para el polipéptido codificado por cada una de las secuencias de nucleótidos correspondiente a SEQ ID NOS: 1-20.

La invención también proporciona un método de matriz de la idoneidad de un anticuerpo anti-TNF α para un trastorno relacionado gastrointestinal en una muestra de paciente de un paciente antes de la administración del anticuerpo anti-TNF α , que comprende la puesta en contacto de la muestra del paciente con el reactivo de la invención y la comparación de los niveles de al menos una parte de cada uno de los genes o proteínas de las secuencias de nucleótidos correspondientes a SEQ ID NOS: 1-20 a un estándar de referencia, en el que el patrón de referencia es de un respondedor al anticuerpo anti-TNF α .

La invención también proporciona un método para probar la eficacia de un anticuerpo anti-TNF α para la colitis ulcerosa, que comprende:

- a) poner en contacto una muestra de un paciente que está siendo tratado para la colitis ulcerosa con el reactivo de la invención;
- b) medir los niveles de los 20 miembros; y
- c) correlacionar los niveles de los 20 miembros con la eficacia del anticuerpo anti-TNF α mediante la comparación de los niveles a los niveles en un estándar de referencia, en el que el patrón de referencia es de un respondedor al anticuerpo anti-TNF α .

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente descripción se refiere a un método para diagnosticar y/o tratar la CU y/o enfermedades o trastornos relacionados y la predicción de la aptitud de agentes candidatos para el tratamiento. La presente descripción incluye el descubrimiento de los paneles de genes, uno de los 20 genes y uno de los cinco genes, que han modificado los niveles de expresión en los pacientes que responden al tratamiento para CU (eficaz en la reducción de los síntomas de la CU) frente a los pacientes que no responden al tratamiento. Los niveles de expresión modificados constituyen un perfil que puede servir como un perfil de biomarcador predictivo de la capacidad de respuesta de un paciente al tratamiento.

En una realización particular, la presente descripción comprende un método para predecir la idoneidad de un tratamiento para la CU basándose en el patrón de la expresión génica de uno o más de los 20 genes que constituyen el perfil antes del tratamiento. Uno o más de estos genes puede ser de una categoría de genes, tales como los implicados en la respuesta de defensa, la respuesta inmune, la transducción de señales, y la respuesta de patógenos como se muestra a continuación y en la Figura 1, y similares. En una realización típica, la muestra de célula expresa al menos dos genes de perfil de expresión. Los genes de perfil pueden mostrar un aumento o disminución.

Además, la presente invención comprende un método de identificación de sujetos con CU y/o enfermedades o trastornos relacionados que son candidatos para el tratamiento con un agente terapéutico particular mediante la evaluación de su perfil de expresión de uno o más genes del panel de genes 20 o 5.

En una realización, el perfil de genes relacionados CU se utiliza para crear un método basado en matriz matriz para fines de pronóstico o de diagnóstico, comprendiendo el método:

- (a) preparar una mezcla representativa de los ácidos nucleicos de una muestra obtenida a partir de un paciente y

causar que dichos ácidos nucleicos de la muestra en la mezcla se etiqueten con un marcador detectable;

5 (b) poner en contacto una muestra con una matriz que comprende una pluralidad de segmentos de ácido nucleico, en donde cada segmento de ácido nucleico se inmoviliza a un lugar discreto y conocido en una superficie del sustrato en el que el panel de biomarcadores relacionados CU se identifica como una característica de la matriz por lugar, la matriz comprende además al menos una calibración de ácido nucleico en un lugar conocido sobre el sustrato, y la puesta en contacto se realiza en condiciones en las que un ácido nucleico de la muestra específicamente puede unirse al segmento de ácido nucleico inmovilizado en la matriz;

10 (c) realizar una comparación estadística de todas las muestras de prueba de pacientes tratados y un estándar de referencia; y

15 (d) comparar el patrón de cambios de intensidad en las características de la muestra de matriz para el patrón de cambios de intensidad para aquellas características que son miembros del perfil de genes relacionados con la CU Histórico de patrones de muestras tomadas de pacientes que responden al tratamiento con un anticuerpo TNF α .

20 Opcionalmente, el análisis estadístico se realiza sobre los cambios en los niveles de los miembros del panel de genes para evaluar la importancia de estos cambios y para identificar qué miembros son miembros significativos del panel.

En una realización alternativa, la presente descripción comprende un kit para predecir la idoneidad de agentes candidatos para el tratamiento de CU y/o enfermedades o trastornos relacionados basándose en el patrón de la expresión génica.

25 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la distribución de los procesos biológicos para los miembros del panel de genes.

30 La Figura 2 muestra el perfil de expresión respondedor/no respondedor Infliximab del conjunto de sonda clasificador 5 en una representación gráfica de puntos que comparan respondedores infliximab (R) para pacientes que no responden (NR). Las intensidades normalizadas de cada muestra se muestran (círculo negro). La intensidad mediana, el percentil 75 y 25 y los valores mínimo y máximo para cada población respondedor y no respondedor para cada uno de los 5 genes también se muestran.

35 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

40 Las siguientes definiciones se exponen para ilustrar y definir el significado y alcance de diversos términos utilizados para describir la presente invención.

45 Una "actividad", una actividad biológica, y una actividad funcional de un polipéptido se refiere a una actividad ejercida por un gen del panel de genes relacionados con CU en respuesta a su interacción específica 5 con otra proteína o molécula como se determina in vivo, in situ, o in vitro, de acuerdo con técnicas estándar. Tales actividades pueden ser una actividad directa, tal como una asociación con o una actividad enzimática en una segunda proteína, o una actividad indirecta, tal como un proceso celular mediado por la interacción de la proteína con una segunda proteína o una serie de interacciones como en señalización intracelular o la cascada de coagulación.

50 Un "anticuerpo" incluye cualquier molécula que contiene polipéptido o péptido que comprende al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina, tal como, pero no limitado a, al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de unión de ligando del mismo, una cadena pesada o cadena ligera de la región variable, una cadena pesada o la región constante de cadena ligera, una región marco, o cualquier parte, fragmento o variante del mismo. El término "anticuerpo", se pretende abarcar anticuerpos, fragmentos de digestión, las partes especificadas y las variantes de los mismos, incluyendo miméticos de anticuerpos o porciones de anticuerpos que imitan la estructura y/o función de un anticuerpo o fragmento especificado o parte del mismo, incluyendo una sola cadena que comprende anticuerpos y fragmentos de los mismos. Por ejemplo, fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, Fab (por ejemplo, por digestión con papaína), Fab (por ejemplo, por digestión con pepsina y reducción parcial) y F(ab')₂ (por ejemplo, mediante digestión con pepsina), facb (por ejemplo, por digestión con plasmina), pFc' (por ejemplo, por los fragmentos de digestión con pepsina o plasmina), Fd (por ejemplo, por digestión con pepsina, reducción parcial y reagregación), Fv o scFv (por ejemplo, por técnicas de biología molecular), y anticuerpos de dominio único (por ejemplo, V_H o V_L), están abarcados por la invención (véase, por ejemplo, Colligan, et al, eds, Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Polypeptide Science, John Wiley & Sons, Nueva York (1997-2001)).

Los términos "matriz" o "micromatriz" o "biochip" o "chip", como se usa en este documento se refieren a artículos de fabricación o dispositivos que comprenden una pluralidad de elementos diana inmovilizados, cada elemento diana que comprende un "clon", "característica", "spot" o área definida que comprende una composición particular, tal como una molécula biológica, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico o polipéptido, inmovilizado a una superficie sólida, como se discute con más detalle, a continuación.

"Complemento de" o "complementaria" a una secuencia de ácido nucleico de la invención se refiere a una molécula de polinucleótido que tiene una secuencia de bases complementaria y orientación inversa en comparación con un primer polinucleótido.

"Identidad", como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, como se determina comparando las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia

entre secuencias de polipéptidos o de polinucleótidos, como se determina por la coincidencia entre cadenas de tales secuencias. "Identidad" y "similitud" se pueden calcular fácilmente por métodos conocidos, incluyendo, pero no limitándose a, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed, Oxford University Press, Nueva York, 1988.; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed, Academic Press, Nueva York, 1993.; Computer Analysis of Sequence Data, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds, Humana Press, Nueva Jersey., 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds, M Stockton Press, Nueva York., 1991; . Y Carillo, H., y Lipman, D., Siam J. Applied Math, 48: 1073 (1988). Además, los valores de porcentaje de identidad pueden ser obtenidos a partir de aminoácidos y alineamientos de secuencias de nucleótidos generados utilizando la configuración predeterminada para el componente AlignX de Vector NTI suite 8.0 (Informax, Frederick, MD).

Los términos "hibridar específicamente con", "específicamente hibridar con", "hibridación específica" y "hibridar selectivamente a", como se usa en este documento se refieren a la unión, formación de dúplex o hibridación de una molécula de ácido nucleico preferentemente a una secuencia de nucleótidos particular en condiciones estrictas. El término "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda hibridará preferentemente con su subsecuencia diana; y en menor medida a, o nada en absoluto a, otras secuencias. Una "hibridación rigurosa" y "condiciones de lavado rigurosas de hibridación" en el contexto de la hibridación de ácidos nucleicos (por ejemplo, como en la matriz, o hibridaciones Southern o Northern) son dependientes de la secuencia y son diferentes bajo diferentes parámetros ambientales. Condiciones de hibridación alternativas que se pueden utilizar para practicar la invención se describen en detalle, a continuación. En aspectos alternativos, las condiciones de hibridación y/o lavado se llevan a cabo bajo condiciones moderadas, condiciones rigurosas y condiciones muy estrictas, como se describe con más detalle, a continuación. Condiciones de lavado alternativas también se utilizan en diferentes aspectos, como se describe con más detalle, en el presente documento.

Las frases "molécula biológica etiquetada" o "marcados con una composición detectable" o "marcado con un radical detectable", según se usa aquí, se refieren a una molécula biológica, por ejemplo, un ácido nucleico, que comprende una composición detectable, es decir, una etiqueta, tal como se describe en detalle, a continuación. La etiqueta también puede ser otra molécula biológica, como un ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico en forma de una estructura de tallo bucle como una "baliza molecular", tal como se describe a continuación. Esto incluye la incorporación de bases marcadas (o, bases que pueden unirse a un marcador detectable) en el ácido nucleico mediante, por ejemplo, desplazamiento de la mella, la extensión del cebador aleatorio, la amplificación con cebadores degenerados, y similares. Cualquier etiqueta se puede utilizar, por ejemplo, marcadores quimioluminiscentes, marcadores radiactivos, marcadores enzimáticos y similares. El marcador puede ser detectable por cualquier medio, por ejemplo, visual, espectroscópico, fotoquímico, bioquímico, inmunoquímico, físico, químico y/o detección quimioluminescente. La invención se puede utilizar matrices que comprenden ácidos nucleicos inmovilizados que comprenden marcadores detectables.

El término "ácido nucleico" tal como se utiliza aquí se refiere a un desoxirribonucleótido (ADN) o ribonucleótidos (RNA) en forma simple o de doble cadena. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales. El término ácido nucleico se usa de forma intercambiable con gen, ADN, ARN, ADNc, ARNm, cebador de oligonucleótidos, sonda y producto de amplificación. El término también abarca análogos de esqueleto de ADN, tales como fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, phosphoram idate, fosfotriéster de alquilo, sulfamato, 3'-tioacetal, metileno (metilimino), 3'-N-carbamato, carbamato de morfolino, y ácidos nucleicos peptídicos (PNAs).

Los términos "muestra" o "muestra de ácidos nucleicos" tal como se utiliza aquí se refieren a una muestra que comprende un ADN o ARN, o el representante de ácidos nucleicos de ADN o ARN aislado de una fuente natural. Una "muestra de ácidos nucleicos" es en una forma adecuada para la hibridación (por ejemplo, como una solución acuosa soluble) a otro ácido nucleico (por ejemplo, sondas inmovilizadas). El ácido nucleico de la muestra puede ser aislado, clonado, o extraído a partir de células o tejidos particulares. La muestra de células o tejido del que se prepara la muestra de ácido nucleico se toma típicamente a partir de un paciente que tiene o se sospecha que tiene CU o una enfermedad relacionada o condición. Los métodos de aislamiento de muestras de células y tejidos son

bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, aspiraciones, cortes de tejido, biopsias de aguja, y similares. Frecuentemente la muestra será una "muestra clínica", que es una muestra derivada de un paciente, incluyendo secciones de tejidos tales como secciones congeladas o secciones en parafina tomadas con fines histológicos. La muestra puede derivar también de sobrenadantes (de células) o las propias células tomadas de pacientes o de cultivos de células, las células de cultivo de tejidos y otros medios en los que puede ser deseable detectar la respuesta a los fármacos candidatos. En algunos casos, los ácidos nucleicos se pueden amplificar utilizando técnicas estándar, tales como PCR, antes de la hibridación. La sonda puede producirse a partir de y colectivamente puede ser representativa de una fuente de ácidos nucleicos a partir de uno o más particulares (preseleccionados) partes de, por ejemplo, una colección de productos de amplificación de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sustancialmente la totalidad de un cromosoma o un cromosoma fragmento, o sustancialmente la totalidad de un genoma, por ejemplo, como una colección de clones, por ejemplo, BACs, PACs, YACs, y similares (véase más adelante).

"Ácidos nucleicos" son polímeros de nucleótidos, en el que un nucleótido comprende una base ligada a un azúcar que los azúcares son, a su vez vinculados uno a otro por una molécula al menos bivalente de intercesión, tal como ácido fosfórico. En ácidos nucleicos naturales, el azúcar es o bien 2'-desoxirribosa (ADN) o ribosa (ARN). Poli o oligonucleotides poco naturales contienen bases modificadas, azúcares, o la vinculación de las moléculas, pero en general se entienden para imitar la naturaleza complementaria de los ácidos nucleicos presentes en la naturaleza después de que se diseñaron. Un ejemplo de un oligonucleótido no natural es una composición de molécula antisentido que tiene una columna vertebral de fosforotiorato. Un "oligonucleótido" se refiere generalmente a una molécula de ácido nucleico que tiene menos de 30 nucleótidos.

El término "perfil" se refiere a un patrón y se refiere a la magnitud y dirección del cambio de una serie de características. El perfil puede interpretarse estrictamente, es decir, donde la variación en la magnitud y/o el número de características dentro del perfil que presenta la característica es sustancialmente similar a un perfil de referencia o puede interpretarse con menos rigor, por ejemplo, al requerir una tendencia en lugar de una coincidencia absoluta de todos o un subconjunto de características de función.

Los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" incluyen "análogos", o "variantes conservadoras" y "miméticos" o "peptidomiméticos" con estructuras y actividad que se corresponden sustancialmente con el polipéptido de la que se deriva la variante, como se discutió en detalle anteriormente.

Un "polipéptido" es un polímero de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, y un péptido generalmente se refiere a polímeros de aminoácidos de 12 o menos residuos. Los enlaces peptídicos se pueden producir de forma natural como dirigido por el molde de ácido nucleico o sintéticamente por métodos bien conocidos en la técnica.

Una "proteína" es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína puede comprender además grupos sustituyentes unidos a los grupos laterales de los aminoácidos no implicados en la formación de los enlaces peptídicos. Típicamente, las proteínas formadas por la expresión en células eucariotas también contienen hidratos de carbono. Las proteínas se definen aquí en términos de su secuencia de aminoácidos o columna vertebral y los sustituyentes no se especifican, ya sean conocidos o no.

El término "receptor" indica una molécula que tiene la capacidad de afectar la actividad biológica, en, por ejemplo, una célula, como resultado de la interacción con un ligando específico o pareja de unión. Receptores unidos a la membrana de la célula se caracterizan por un dominio de unión a ligando extracelular, uno o más dominios que abarca membranas o transmembranas, y un dominio efector intracelular que típicamente está implicado en la transducción de señales. La unión de ligandos a receptores de membrana celular provoca cambios en el dominio extracelular que se comunican a través de la membrana celular, la interacción directa o indirecta con una o más proteínas intracelulares, y altera las propiedades celulares, tales como la actividad enzimática, forma de la célula, o el perfil de la expresión génica. Los receptores también pueden ser no atados a la superficie celular y pueden ser citosólicos, nucleares, o liberados de la célula por completo. Receptores asociados no celulares se denominan receptores o ligandos solubles.

Las siguientes referencias son relevantes: Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1987 2001); Sambrook, et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow y Lane, anticuerpos, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., Eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1994 2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY (1997 2001).

Panel de Genes de Identificación y Validación

La presente descripción proporciona métodos novedosos para la detección de composiciones que modulan los síntomas de la CU, en particular la capa de la mucosa del recto y la totalidad o parte del colon. Por "CU" o equivalentes gramaticales en la presente memoria, se entiende un estado de enfermedad o condición que se caracteriza por diarrea, sangrado rectal, tenesmo, eliminación de moco y dolor abdominal por calambres.

En un aspecto, los niveles de expresión de genes se determinan en diferentes muestras de pacientes para los que se desea la información de diagnóstico, para proporcionar perfiles de expresión. Un perfil de expresión de una muestra particular es esencialmente una "huella dactilar" del estado de la muestra; mientras que dos estados pueden tener cualquier gen particular expresado de manera similar, la evaluación de un número de genes que simultáneamente permite la generación de un perfil de expresión de genes que es único para el estado de la muestra del paciente. Es decir, el tejido normal se puede distinguir de tejido de lesión y tejido de un paciente tratado puede ser distinguido de un paciente no tratado. Mediante la comparación de perfiles de expresión de tejido en diferentes estados de enfermedad que se conocen, la información relativa a qué genes son importantes (incluyendo regulación de genes hacia arriba y hacia abajo) se obtiene en cada uno de estos estados.

La identificación de secuencias (genes) que son expresadas diferencialmente en el tejido de la enfermedad permite el uso de esta información en un número de maneras. Por ejemplo, la evaluación de un régimen de tratamiento particular puede ser evaluada.

Esto se puede realizar al hacer biochips que comprenden series de los genes de enfermedades importantes, que luego se pueden utilizar en estas pantallas. Estos métodos también se pueden realizar sobre la base de proteínas; es decir, los niveles de expresión de proteínas de las proteínas de productos de genes relacionados con la CU pueden evaluarse con fines de diagnóstico o para examinar agentes candidatos. Además, las secuencias de ácido nucleico que comprenden el gen relacionado con el perfil CU se pueden utilizar para medir si un paciente es probable que responda a un tratamiento terapéutico previo.

Secuencias de genes relacionadas con la CU pueden incluir tanto secuencias de ácidos nucleicos como de aminoácidos. En una realización preferida, las secuencias de genes relacionados CU son ácidos nucleicos recombinantes. Por el término "ácido nucleico recombinante" en el presente documento se quiere decir "ácido nucleico", formado originalmente in vitro, en general, mediante la manipulación de ácido nucleico mediante polimerasas y endonucleasas, en una forma no encontrada normalmente en la naturaleza. Por lo tanto, un ácido nucleico aislado, en una forma lineal, o un vector de expresión formado in vitro mediante la ligación de moléculas de ADN que normalmente no están unidos, se consideran ambos recombinantes para los fines de esta invención. Se entiende que una vez que un ácido nucleico recombinante se hace y se reintroduce en una célula u organismo huésped, se replicará de forma no recombinante, es decir, usando la maquinaria celular in vivo de la célula huésped en lugar de manipulaciones in vitro; sin embargo, tales ácidos nucleicos, una vez producidos de forma recombinante, aunque posteriormente se replican de modo no recombinante, se consideran recombinantes a efectos de la invención.

Método de práctica de la invención

La invención proporciona in silico, los métodos basados en la matriz que dependen de la cantidad relativa de una molécula de unión (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico) en dos o más muestras. También se proporcionan métodos implementados por ordenador para determinar la cantidad relativa de una molécula de unión (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico) en dos o más muestras y el uso de la cantidad de unión relativa determinada para predecir la respuesta a una terapia en particular, y supervisar y mejorar el tratamiento terapéutico.

En la práctica de los métodos de la descripción, dos o más muestras de moléculas biológicas marcadas (por ejemplo, ácido nucleico) se aplican a dos o más matrices, en las que las matrices tienen sustancialmente el mismo complemento de la molécula de unión inmovilizada (por ejemplo, el ácido nucleico inmovilizado capaz de hibridar con el ácido nucleico de la muestra de etiqueta). Las dos o más matrices son típicamente múltiples copias de la misma matriz. Sin embargo, debido a que cada "punto", "clon" o "función" en la matriz tiene moléculas biológicas similares (por ejemplo, los ácidos nucleicos de la misma secuencia) y las moléculas biológicas (por ejemplo, ácido nucleico) en cada punto se conoce, como es típico de ácido nucleico y otras matrices, no es necesario que las múltiples matrices utilizadas en la invención sean idénticas en configuración sólo es necesario que la posición de cada característica sobre el sustrato se conoce, es decir, tener una dirección. Por lo tanto, en un aspecto, múltiples moléculas biológicas (por ejemplo, ácido nucleico) en muestras están obligados comparativamente a la matriz (por ejemplo, se hibridó de forma simultánea) y la información reunida se codifica de manera que los resultados se basan en las propiedades inherentes de la característica (por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico) y no su posición sobre el sustrato.

Amplificación de ácidos nucleicos

La amplificación utilizando los cebadores de oligonucleótidos se puede utilizar para generar ácidos nucleicos utilizados en las composiciones y métodos de la invención, para detectar o niveles de las muestras de matriz o de control se hibridaron a una matriz, y similares. El experto en la técnica puede seleccionar y diseñar cebadores de amplificación de oligonucleótidos adecuados. Los métodos de amplificación son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa, PCR (PCR PROTOCOLS, A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, ed. Innis, Academic Press, N.Y. (1990) y PCR STRATEGIES (1995), ed. Innis, Academic Press, Inc., N.Y., reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véase, por ejemplo, Wu (1989) Genómica 4: 560;

Landegren (1988) Science 241: 1077; Barringer (1990) Gen 89: 117); la amplificación de la transcripción (véase, por ejemplo, Kwok (1989) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 86: 1173); y replicación de secuencias autosostenidas (véase, por ejemplo, Guatelli (1990) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 87: 1874); amplificación de replicasa Q Beta (véase, por ejemplo, Smith (1997) J. Clin Microbiol. 35: 14771491), matriz de amplificación beta replicasa Q automatizado (véase, por ejemplo, Burg (1996) Mol Cell sondas 10: 257 271) y otras técnicas mediadas de polimerasa ARN (por ejemplo, NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario); véase también Berger (1987) Methods Enzymol. 152:307-316; Sambrook; Ausubel; La patente de EE.UU. N°s 4.683.195 y 4.683.202.; Sookninan (1995) Biotecnología 13: 563564.

10 Hibridación de ácidos nucleicos

En la práctica de los métodos de las muestras de divulgación, matriz y control de ácido nucleico se hibridan con el ácido nucleico de sonda inmovilizada, por ejemplo, en matrices. En aspectos alternativos, las condiciones de hibridación y/o lavado se llevan a cabo bajo condiciones moderadas, condiciones estrictas y condiciones muy estrictas. Una extensa guía para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en, por ejemplo, Sambrook Ausubel, Tijssen. En general, la hibridación altamente rigurosa y condiciones de lavado se seleccionan para ser aproximadamente 5°C más baja que el punto de fusión térmico (Tm) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La Tm es la temperatura (bajo una fuerza iónica y pH definidos) a la que 50% de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente coincidente. Condiciones muy rigurosas se seleccionan para que sean iguales a la Tm para una sonda particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 residuos complementarios en una matriz o un filtro en una transferencia Southern o Northern es 42°C usando soluciones de hibridación estándar (véase, por ejemplo, Sambrook), con la hibridación se lleva a cabo durante la noche. Un ejemplo de condiciones de lavado altamente rigurosas es 0,15 M NaCl a 72°C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas es un lavado de 0,2xSSC a 65°C durante 15 minutos (véase, por ejemplo, Sambrook). A menudo, un lavado de alta rigurosidad está precedida por un lavado de rigurosidad media o baja para eliminar la señal de sonda de fondo. Una astringencia de ejemplo de lavado medio para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es 1xSSC a 45°C durante 15 minutos. Un ejemplo de un lavado de baja rigurosidad para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es 4x a 6xSSC a 40°C durante 15 minutos.

En aspectos alternativos de las composiciones y métodos, por ejemplo, en la práctica de la hibridación comparativa de ácido nucleico, tales como hibridación genómica comparada (CGH) con ensayos, los colorantes fluorescentes Cy3® y Cy5® se utilizan para etiquetar diferencialmente fragmentos de ácido nucleico a partir de dos muestras, por ejemplo, la matriz de ácido nucleico inmovilizada en comparación con el ácido nucleico de la muestra, o, ácido nucleico generado a partir de un control frente a una célula o tejido de prueba. Muchos instrumentos comerciales están diseñados para dar cabida a la detección de estos dos tintes. Para aumentar la estabilidad de Cy5®, o compuestos fluorescentes u otros compuestos sensibles a la oxidación, antioxidantes y eliminadores de radicales libres se pueden utilizar en las mezclas de hibridación, la hibridación y/o las soluciones de lavado. Por lo tanto, las señales Cy5® se incrementan dramáticamente y tiempos de hibridación más largos son posibles. Véase el documento WO 0194630 A2 y la solicitud de patente de EE.UU. n° 20020006622.

Para aumentar aún más la sensibilidad de la hibridación, la hibridación puede llevarse a cabo en un ambiente de humedad controlada e insaturada; Por lo tanto, la eficiencia de la hibridación se mejora significativamente si la humedad no está saturada. Véase WO 0194630 A2 y solicitud de patente de EE.UU. N°. 20020006622. La eficiencia de hibridación se puede mejorar si la humedad está controlada dinámicamente, es decir, si los cambios de humedad durante la hibridación. La transferencia de masa se verá facilitada en un ambiente de humedad equilibrada dinámicamente. La humedad en el entorno de la hibridación se puede ajustar por etapas o continuamente. Dispositivos de matriz comprenden carcasas y controles que permiten al operador controlar la humedad durante la prehibridación, hibridación, lavado y/o etapas de detección se puede utilizar. El dispositivo puede tener componentes de detección, de control y de memoria para permitir la preprogramación de los controles de humedad y temperatura (que son constantes y precisas o que fluctúan), y otros parámetros durante todo el ciclo de procedimiento, incluyendo la prehibridación, hibridación, lavado y etapas de detección. Véase el documento WO 0194630 A2 y la solicitud de patente de EE.UU. n° 20020006622.

Los métodos pueden comprender condiciones de hibridación que comprenden fluctuación osmótica. Eficiencia de hibridación (es decir, el tiempo de equilibrio) también se puede mejorar por un entorno de hibridación que comprende el cambio de la tonicidad hiper/hipo, por ejemplo, un gradiente de soluto. Un gradiente de soluto se crea en el dispositivo. Por ejemplo, una solución de hibridación de baja sal se coloca en un lado de la cámara de hibridación matriz y un tampón de sal más alta se coloca en el otro lado para generar un gradiente de soluto en la cámara. Véase el documento WO 0194630 A2 y la solicitud de patente de EE.UU. n° 20020006622.

Bloqueo de la capacidad de secuencias repetitivas de ácido nucleico para hibridarse

Los métodos pueden comprender una etapa de bloqueo de la capacidad de las secuencias repetitivas de ácido nucleico para hibridarse (es decir, el bloqueo de la "capacidad de hibridación") en los segmentos de ácidos nucleicos inmovilizados. La capacidad de hibridación de secuencias repetitivas de ácido nucleico en las secuencias de ácido

nucleico de la muestra puede ser bloqueada mediante la mezcla de secuencias de ácido nucleico de la muestra con secuencias repetitivas de ácido nucleico sin etiqueta o alternativamente etiquetadas. Secuencias de ácido nucleico de la muestra se pueden mezclar con secuencias repetitivas de ácido nucleico antes de la etapa de puesta en contacto con los segmentos de ácido nucleico inmovilizados de matriz. Secuencias de bloqueo son, por ejemplo, Cot-1-ADN, ADN de esperma de salmón, o secuencias genómicas repetitivas específicas. Las secuencias repetitivas de ácido nucleico pueden no marcarse. Un número de métodos para retirar y/o desactivar la capacidad de hibridación de secuencias repetitivas usando, por ejemplo, Cot-1 se conocen; ver, por ejemplo, Craig (1997) Hum. Genet. 100: 472-476; WO 93/18186. Secuencias repetitivas de ADN se pueden eliminar de las sondas de biblioteca por medio de purificación magnética y afinidad PCR, véase, por ejemplo, Rauch (2000) J. Biochem. Biophys. Métodos 44:59-72.

Las matrices son genéricamente una pluralidad de elementos diana inmovilizada sobre la superficie de la placa tal como se definen los "puntos" o "clusters", o "funciones", con cada elemento diana que comprende una o más moléculas biológicas (por ejemplo, ácidos nucleicos o polipéptidos) inmovilizados a una superficie sólida para la unión (por ejemplo, la hibridación) específica a una molécula en una muestra. Los ácidos nucleicos inmovilizados pueden contener secuencias de mensajes específicos (por ejemplo, como bibliotecas de ADNc) o genes (por ejemplo, bibliotecas genómicas), incluyendo un genoma humano. Otros elementos diana pueden contener secuencias de referencia y similares. Las moléculas biológicas de las matrices se pueden disponer sobre la superficie sólida en diferentes tamaños y de diferentes densidades. Las densidades de las moléculas biológicas de un clúster y el número de grupos en la matriz dependerá de una serie de factores, como la naturaleza del marcador, el soporte sólido, el grado de hidrofobicidad de la superficie del sustrato, y similares. Cada característica puede comprender sustancialmente la misma molécula biológica (por ejemplo, ácido nucleico), o, una mezcla de moléculas biológicas (por ejemplo, ácidos nucleicos de diferentes longitudes y/o secuencias). Así, por ejemplo, una característica puede contener más de una copia de un trozo clonado de ADN, y cada copia puede ser rota en fragmentos de diferentes longitudes.

Superficies de sustrato de matriz sobre las que se inmovilizan las moléculas biológicas (por ejemplo, ácidos nucleicos) pueden incluir nitrocelulosa, vidrio, cuarzo, sílice fundida, plásticos y similares, como se discute más, a continuación. Las composiciones y métodos pueden incorporar en su totalidad o en diseños de piezas de matrices y los componentes asociados y métodos, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N^os. 6.344.316; 6.197.503; 6.174.684; 6.159.685; 6.156.501; 6.093.370; 6.087.112; 6.087.103; 6.087.102; 6.083.697; 6.080.585; 6.054.270; 6.048.695; 6.045.996; 6.022.963; 6.013.440; 5.959.098; 5.856.174; 5.843.655; 5.837.832; 5.770.456; 5.723.320; 5.700.637; 5.695.940; 5.556.752; 5.143.854; véase también, por ejemplo, el documento WO 99/51773; WO 99/09217; WO 97/46313; WO 96/17958; WO 89/10977; véase también, por ejemplo, Johnston (1998) Curr. Biol. 8:R171-174; Schummer (1997) Biotechniques 23:1087-1092; Kern (1997) Biotechniques 23:120-124; Solinas Toldo (1997) Genes, Chromosomes & Cancer 20:399-407; Bowtell (1999) Nature Genetics Supp. 21:25-32; Epstein (2000) Current Opinion in Biotech. 11:36-41; Mendoza (1999) Biotechniques 27:778-788; Lueking (1999) Anal Biochem. 270:103-111; Davies (1999) Biotechniques 27:1258-1261.

Superficies de sustrato

Superficies de sustrato que se pueden utilizar en las composiciones y métodos incluyen, por ejemplo, de vidrio (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N^o. 5.843.767), cerámica y cuarzo. Las matrices pueden tener superficies de sustrato de un material rígido, semirígido y flexible. La superficie del sustrato puede ser plana o planar, tener la forma de pozos, regiones elevadas, zanjadas grabadas al agua fuerte, poros, granos, filamentos o similares. Superficies de sustrato también pueden comprender diversos materiales tales como nitrocelulosa, papel, sustratos cristalinos (por ejemplo, arseniuro de galio), metales, metaloides, poliacrilolmorfida, diversos plásticos y copolímeros de plástico, Nylon®, Teflon®, polietileno, polipropileno, látex, polimetacrilato, poli(etileno de tereftalato), rayón, nilon, poli (vinilo de butirato), y acetato de celulosa. Los sustratos pueden recubrirse y el subestado y el revestimiento puede ser funcionalizado para, por ejemplo, permitir la conjugación a una amina.

Matrices que comprenden la secuencia de calibración

La "divulgación" comprende el uso de matrices que comprenden secuencias de calibración inmovilizadas para la normalización de los resultados de las reacciones de hibridación a base de matriz, y los métodos para el uso de estas secuencias de calibración, por ejemplo, para determinar el número de copias de una secuencia de calibración para "normalizar" o "calibrar" perfiles de relación. Las secuencias de calibración pueden ser sustancialmente las mismas que una secuencia única en una secuencia de ácido nucleico inmovilizada en una matriz. Por ejemplo, una secuencia de "marcador" de cada "punto" o "biosite" en una matriz (que sólo está presente en ese punto, lo que es un "marcador" para ese punto) está representado por una secuencia correspondiente en uno o más "control" o punto de "calibración".

Los "puntos de control" o "puntos de calibración" se utilizan para la "normalización" para proporcionar información que sea fiable y repetible. Puntos de control pueden proporcionar un resultado consistente independiente de la muestra marcada se hibrida con la matriz (o una molécula de unión marcada de una muestra). Los puntos de control se pueden utilizar para generar una "normalización" o curva "calibración" para compensar los posibles errores de

intensidad entre las dos matrices (o más) usadas en los métodos in silico, a base de matriz de la divulgación.

Un método de generación de un control en la matriz sería el uso de una mezcla equimolar de todas las moléculas biológicas (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico) manchas en la matriz y la generación de un solo punto. Este solo punto tendría la misma cantidad de las moléculas biológicas (por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos) de todos los demás puntos de la matriz. Puntos de control múltiples se pueden generar mediante la variación de la concentración de la mezcla equimolar.

Muestras y ejemplares

El ácido nucleico de la muestra puede ser aislado, clonado, o extraído de células particulares, tejidos u otras muestras. La muestra de células o tejido del que se prepara la muestra de ácido nucleico se toma típicamente a partir de un paciente que tiene o se sospecha que tiene CU o una condición relacionada. Los métodos de aislamiento de muestras de células y tejidos son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, aspiraciones, cortes de tejido, biopsias de aguja, y similares. Frecuentemente, la muestra será una "muestra clínica", que es una muestra derivada de un paciente, incluyendo sangre completa, o secciones de tejidos, tales como secciones congeladas o secciones en parafina tomadas con fines histológicos. La muestra puede derivar también de sobrenadantes (de células) o las propias células tomadas de pacientes o de cultivos de células, las células de cultivo de tejidos y otros medios en los que puede ser deseable para detectar la respuesta a los fármacos candidatos. En algunos casos, los ácidos nucleicos se pueden amplificar utilizando técnicas estándar, tales como PCR, antes de la hibridación.

En una realización, la presente invención es un método de pretratamiento de la predicción de regresión o resolución de la enfermedad. El método incluye (1) tomar una biopsia de colon u otra muestra de un individuo diagnosticado con CU o una enfermedad relacionada o trastorno, (2) la medición de los niveles de expresión de los genes del perfil del panel, (3) comparar el nivel de expresión pretratamiento de los genes con un perfil de referencia de pretratamiento de respondedores al tratamiento, y (4) la predicción de la respuesta al tratamiento mediante el control de los niveles de expresión del panel de gen.

Métodos de utilidad de evaluación de biomarcadores

La utilidad de pronóstico de la presente panel de gen marcador biológico para evaluar la respuesta de un paciente al tratamiento o el pronóstico de la enfermedad puede ser validada por el uso de otros medios para evaluar el estado de la enfermedad de un paciente. Por ejemplo, la medición bruta de la enfermedad puede ser evaluada y registrada por ciertos métodos de formación de imágenes, tales como, pero no limitándose a: formación de imágenes por fotográfico, radiométrico, o tecnología de resonancia magnética. Los índices generales de salud o enfermedad incluyen suero o composición de la sangre (proteínas, enzimas hepáticas, pH, electrolitos, volumen de células rojas, hematocrito, hemoglobina, o proteína específica). Sin embargo, en algunas enfermedades, la etiología aún es poco conocida. CU es un ejemplo de una de esas enfermedades.

Evaluación y monitoreo del paciente

Algunos de los genes en el panel pertenecen a clases de genes que se han reportado que se expresa de forma aberrante anteriormente en los pacientes CU, tales como factores de transcripción, proteínas de replicación, y oxidasas, los patrones de expresión de los genes en el transcurso de tratamiento no han sido estudiado para el tratamiento CU, y ninguno ha sido identificado por tener un valor predictivo. El panel de biomarcadores de expresión génica descrita en este documento permite la generación de métodos para la predicción rápida y fiable, las herramientas de diagnóstico que predicen el resultado clínico de una matriz UC, o herramientas de pronóstico para el seguimiento de la eficacia de la terapia CU. Se proporcionan métodos de pronóstico basados en la detección de estos genes en una muestra. Estas composiciones se pueden utilizar, por ejemplo, en relación con el diagnóstico, prevención y tratamiento de una amplia gama de enfermedades inflamatorias inmunomediadas.

Agentes terapéuticos

Antagonistas

Tal como se utiliza aquí, el término "antagonistas" se refiere a sustancias que inhiben o neutralizan la actividad biológica del producto del gen del panel de genes relacionados CU de la descripción. Dichos antagonistas logran este efecto en una variedad de maneras. Una clase de antagonistas se unirá a la proteína producto del gen con la suficiente afinidad y especificidad para neutralizar los efectos biológicos de la proteína. Se incluyen en esta clase de moléculas anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (tales como, por ejemplo, F(ab) o F(ab')₂ moléculas). Otra clase de antagonistas comprende fragmentos de la proteína producto del gen, muteínas o moléculas orgánicas pequeñas, es decir, peptidomiméticos, que se unirán a los integrantes de unión análogos o ligandos del producto del gen, lo cual inhibe la actividad biológica de la interacción específica del producto génico con su ligando afín o receptor. El antagonista del gen relacionado con CU puede ser de cualquiera de estas clases con tal de que es una sustancia que inhibe al menos una actividad biológica del producto del gen.

Antagonistas incluyen anticuerpos dirigidos a una o más regiones de la proteína producto del gen o sus fragmentos, anticuerpos dirigidos al ligando afín o receptor, y péptidos parciales del producto del gen o de su ligando afín que inhiben al menos una actividad biológica del producto del gen. Otra clase de antagonistas incluye SiARNs, ShARNs, moléculas antisentido y ADNzimas dirigidos a la secuencia del gen tal como se conoce en la técnica se dan a conocer en el presente documento.

Los anticuerpos adecuados incluyen aquellos que compiten por la unión a los productos de genes relacionados CU con anticuerpos monoclonales que bloquean la activación de productos de genes relacionados con CU o previenen CU producto del gen relacionado unión a su ligando afín, o previenen la señalización de producto del gen relacionado CU.

Una práctica terapéutica dirigida al inductor del producto del gen relacionado con la CU podría obtener mejores posibilidades de éxito. La expresión génica se puede modular de varias maneras diferentes, incluyendo mediante el uso de SiARNs, ShARNs, moléculas antisentido y ADNzimas. SiARNs sintéticos, ShARNs, y ADNzimas pueden diseñarse para dirigirse específicamente a uno o más genes y que pueden ser fácilmente transportados a las células in vitro o in vivo.

La presente descripción abarca moléculas de ácido nucleico antisentido, es decir, moléculas que son complementarias a un ácido nucleico sentido que codifica un polipéptido de productos de genes relacionados con CU, por ejemplo, complementaria a la cadena codificante de una molécula de ADNc bicatenaria o complementaria a una secuencia de ARNm. De acuerdo con ello, un ácido nucleico antisentido puede realizar un enlace de hidrógeno a un ácido nucleico sentido. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a una cadena codificante, o sólo a una parte del mismo, por ejemplo, toda o parte de la región codificante de proteína (o marco de lectura abierto). Una molécula de ácido nucleico antisentido puede ser antisentido a toda o parte de una región no codificante de la cadena codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de productos de genes relacionados con CU. Las regiones no codificantes ("5' y 3' no traducidas") son las secuencias 5' y 3' que flanquean la región codificante y no se traducen en aminoácidos.

La descripción también proporciona proteínas quiméricas o de fusión. En la presente memoria, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" comprende todo o parte (preferiblemente biológicamente activa) de un polipéptido de productos de genes relacionados con CU unido operativamente a un polipéptido heterólogo (es decir, un polipéptido distinto del mismo polipéptido de productos de genes relacionados con CU). Dentro de la proteína de fusión, el término "unido operativamente" pretende indicar que el polipéptido de productos de genes relacionados con CU y el polipéptido heterólogo están fusionados en marco entre sí. El polipéptido heterólogo puede fusionarse al extremo amino o al extremo carboxilo del polipéptido producto génico relacionado CU. En otra realización, un polipéptido de productos de genes relacionados con CU o un dominio o fragmento activo del mismo se pueden fusionar con una secuencia de proteína heteróloga o fragmento de la misma para formar una proteína quimérica, en donde los polipéptidos, dominios o fragmentos no se fusionan un extremo al otro, pero se interponen en el marco de proteína heteróloga.

En aún otra realización, la proteína de fusión es una proteína de fusión de inmunoglobulina en la que todo o parte de un polipéptido de productos de genes relacionados CU está fusionado a secuencias derivadas de un miembro de la familia de proteínas de inmunoglobulina. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina de la descripción se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas y administrarse a un sujeto para inhibir una interacción entre un ligando (soluble o unido a membrana) y una proteína en la superficie de una célula (receptor), para suprimir de ese modo la transducción de señales in vivo. La proteína de fusión de inmunoglobulina puede ser usada para afectar a la biodisponibilidad de un ligando cognado de un polipéptido de productos de genes relacionados con CU. La inhibición de la interacción ligando/receptor puede ser útil terapéuticamente, tanto para el tratamiento de trastornos proliferativos y diferenciativos y para modular (por ejemplo, promover o inhibir) la supervivencia celular. Una realización preferida de una proteína quimérica de inmunoglobulina es una inmunoglobulina de dominio eliminado C_H1 o construcción MIMETIBODY™ que tiene un fragmento de polipéptido activo interpuesto dentro de una región marco modificada como se enseña en tramitación junto con la solicitud PCT WO/04002417. Por otra parte, las proteínas de fusión de inmunoglobulina de la descripción pueden utilizarse como inmunógenos para producir anticuerpos dirigidos contra un polipéptido de productos de genes relacionados con CU en un sujeto, para purificar ligandos en matrices de selección para identificar moléculas que inhiben la interacción de los receptores con ligandos.

Composiciones y sus usos

De acuerdo con la divulgación, los antagonistas de productos de genes relacionados anti CU neutralizantes, tales como anticuerpos monoclonales, que se describen en el presente documento se pueden usar para inhibir la actividad del producto génico relacionado CU. Además, tales antagonistas pueden usarse para inhibir la patogénesis de la CU y enfermedades inflamatorias relacionadas susceptibles de tal tratamiento, que puede incluir, pero no se limitan a, enfermedades reumáticas. El individuo a ser tratado puede ser cualquier mamífero y es preferiblemente un primate, un animal de compañía, que es un mamífero y más preferiblemente un paciente humano. La cantidad de

antagonista administrada variará de acuerdo con el propósito para el que está siendo utilizado y el método de administración.

Los antagonistas de genes relacionados con la CU se pueden administrar por cualquier número de métodos que dan como resultado un efecto en el tejido en el que se desea que la actividad patológica se prevenga o se detenga. Además, los antagonistas de productos de genes relacionados anti-CU no necesitan estar presentes localmente para impartir un efecto sobre la actividad del producto génico relacionado CU, por lo tanto, pueden ser administrados por donde se logra el acceso a los compartimentos del cuerpo o fluidos que contienen productos de genes relacionados con CU. En el caso de los tejidos inflamados, malignos, o comprometidos de otro modo, estos métodos pueden incluir la aplicación directa de una formulación que contiene los antagonistas. Tales métodos incluyen la administración intravenosa de una composición líquida, la administración transdérmica de una formulación líquida o sólida, oral, administración tópica, o administración intersticial o interoperatoria. La administración puede verse afectada por la implantación de un dispositivo cuya función primaria no puede ser como vehículo de administración de fármacos.

Para los anticuerpos, la dosificación preferida es de aproximadamente 0,1 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal (generalmente de aproximadamente 10 mg/kg a 20 mg/kg). Si el anticuerpo es el de actuar en el cerebro, una dosis de aproximadamente 50 mg/kg a 100 mg/kg es generalmente apropiada. Generalmente, los anticuerpos parcialmente humanos y los anticuerpos completamente humanos tienen una vida media más larga dentro del cuerpo humano que otros anticuerpos. De acuerdo con ello, el uso de dosis más bajas y una administración menos frecuente es a menudo posible. Modificaciones, tales como lipidación, se pueden utilizar para estabilizar anticuerpos y para mejorar la penetración y la absorción de tejido (por ejemplo, en el cerebro). Un método para la lipidación de anticuerpos se describe por Cruikshank et al. ((1997) *J. Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* 14: 193).

Las moléculas de ácido nucleico antagonistas de productos de genes relacionados con CU pueden insertarse en vectores y usarse como vectores de terapia génica. Los vectores de terapia génica pueden administrarse a un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (Patente de Estados Unidos Nº. 5.328.470), o mediante inyección estereotáctica (véase, por ejemplo, Chen et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 91:3054-3057). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que está embebida el vehículo de suministro de genes. Alternativamente, cuando el vector de suministro de genes completo puede producirse intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de suministro de genes.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, paquete, o dispensador junto con instrucciones para la administración.

Farmacogenómica

Agentes, o moduladores que tienen un efecto estimulador o inhibidor sobre la actividad o expresión de un polipéptido de productos de genes relacionados con CU como se identifica mediante una matriz de selección descrita en el presente documento, pueden administrarse a individuos para tratar (profiláctica o terapéuticamente) trastornos asociados con la actividad aberrante del polipéptido. Junto con dicho tratamiento, la farmacogenómica (es decir, el estudio de la relación entre genotipo de un individuo y la respuesta de ese individuo a un compuesto extraño o fármaco) del individuo puede ser considerado. Las diferencias en el metabolismo de terapéutica pueden conducir a toxicidad grave o fracaso terapéutico al alterar la relación entre la dosis y la concentración en sangre del fármaco farmacológicamente activo. Por lo tanto, la farmacogenómica del individuo permite la selección de agentes eficaces (por ejemplo, medicamentos) para tratamientos profilácticos o

terapéuticos basados en la consideración del genotipo del individuo. Tal farmacogenómica se puede usar además para determinar las dosis apropiadas y regímenes terapéuticos. Por consiguiente, el producto del gen de actividad de un polipéptido de CU relacionada, expresión de un ácido nucleico producto de genes relacionados con CU, o mutación de un gen contenido producto génico CU relacionada en un individuo se puede determinar para seleccionar de este modo un agente apropiado para el tratamiento terapéutico o profiláctico del individuo.

La farmacogenómica se ocupa de variaciones hereditarias clínicamente significativas en la respuesta a fármacos debido a la alteración de la disposición del fármaco y la acción anormal en las personas afectadas. Véase, por ejemplo, Linder (1997) *Clin. Chem.* 43 (2): 254-266. En general, los dos tipos de condiciones farmacogenéticas se pueden diferenciar. A condiciones genéticas transmitidas como un factor único que altera la forma en que los fármacos actúan sobre el cuerpo se hace referencia como "acción del fármaco alterado". Condiciones genéticas transmitidas como factores individuales que alteran la forma en que el cuerpo actúa sobre los fármacos se conocen como "alteración del metabolismo de fármacos." Estas condiciones farmacogenéticas pueden ocurrir ya sea como defectos raros o como polimorfismos. Por ejemplo, la deficiencia de deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato (G6PD) es una enzimopatía heredada común en la que la principal complicación clínica es la hemólisis después de la ingestión de fármacos oxidantes (antipalúdicos, sulfonamidas, analgésicos, nitrofuranos) y el consumo de habas.

Como una forma de realización ilustrativa, la actividad de las enzimas que metabolizan fármacos es un determinante importante de la intensidad y duración de la acción del fármaco. El descubrimiento de polimorfismos genéticos de enzimas que metabolizan fármacos (por ejemplo, N-acetiltransferasa 2 (NAT 2) y enzimas de citocromo P450 CYP2D6 y CYP2C19) ha proporcionado una explicación de por qué algunos pacientes no obtienen los efectos del fármaco esperados o muestran una respuesta exagerada al fármaco y toxicidad grave después de tomar la dosis estándar y segura de un fármaco. Estos polimorfismos se expresan en dos fenotipos en la población, el metabolizador (EM) y metabolizador lento (PM). La prevalencia de PM es diferente entre las diferentes poblaciones. Por ejemplo, el gen que codifica CYP2D6 es altamente polimórfico y se han identificado varias mutaciones en PM, que conducen a la ausencia de CYP2D6 funcional. Los metabolizadores lentos de CYP2D6 y CYP2C19 con bastante frecuencia experimentan respuesta exagerada al fármaco y efectos secundarios cuando reciben dosis estándar. Si un metabolito es el resto terapéutico activo, un PM no mostrará respuesta terapéutica, como se demuestra para el efecto analgésico de la codeína mediado por su morfina de metabolito en forma de CYP2D6. El otro extremo son los llamados metabolizadores rápidos de ultra que no responden a dosis estándar. Recientemente, la base molecular del metabolismo ultrarrápido se ha identificado que es debido a la amplificación del gen CYP2D6.

Por lo tanto, la actividad de un polipéptido de productos de genes relacionados con CU, la expresión de un ácido nucleico que codifica el polipéptido, o el contenido de mutación de un gen que codifica el polipéptido en un individuo se puede determinar para seleccionar de ese modo agente(s) apropiado(s) para el tratamiento terapéutico o profiláctico del individuo. Además, los estudios farmacogenéticos pueden usarse para aplicar el genotipado de alelos polimórficos que codifican enzimas metabolizadoras de fármacos a la identificación del fenotipo de capacidad de respuesta a fármacos de los individuos. Este conocimiento, cuando se aplica a la dosificación o selección de fármacos, puede evitar reacciones adversas o el fracaso terapéutico y de este modo aumentar la eficiencia terapéutica o profiláctica cuando se trata un sujeto con un modulador de la actividad o la expresión del polipéptido, tal como un modulador identificado por uno de los ejemplos de matrices de selección descritos en el presente documento.

Métodos de Tratamiento

La presente descripción proporciona por tanto métodos profilácticos y terapéuticos de tratamiento de un sujeto a riesgo de (o susceptible de) un trastorno o que tiene un trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de un polipéptido de productos de genes relacionados con CU y/o en el que el polipéptido de producto genético relacionado con la CU esté involucrado.

La presente descripción proporciona un método para modular o tratar enfermedades relacionadas con al menos una enfermedad o condición relacionada con el producto del gen relacionado con CU o, en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, como se conoce en la técnica o como se describe en el presente documento, usando al menos un producto génico antagonista relacionado con la CU.

Las composiciones de producto génico antagonista relacionado con la CU pueden encontrar uso terapéutico en el tratamiento de la CU o condiciones relacionadas, tales como la enfermedad de Crohn u otros trastornos gastrointestinales.

La presente descripción también proporciona un método para modular o tratar al menos una enfermedad gastrointestinal relacionada con la inmunidad, en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, incluyendo, pero no limitado a, al menos uno de úlcera gástrica, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, patología de Crohn, y similares. Véase, por ejemplo, el Merck Manual, 12^a Edición 17, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., eds., Segunda Edición, Appleton & Lange, Stamford, Conn., (1998, 2000).

Trastornos caracterizados por la expresión o actividad aberrante de polipéptidos de productos de gen relacionado con CU se describen más detalladamente en otra parte de esta descripción.

1. Métodos profilácticos

En un aspecto, la descripción proporciona un método para prevenir al menos sustancialmente en un sujeto, una enfermedad o afección asociada con una expresión o actividad aberrante de un polipéptido producto génico relacionado con la CU, por administración al sujeto de un agente que modula la expresión o al menos una actividad del polipéptido. Los sujetos a riesgo de una enfermedad que es causada o parcialmente, por la expresión o actividad aberrante de un producto de gen relacionado con la CU pueden identificarse por, por ejemplo, cualquiera o una combinación de matrices de diagnóstico o pronóstico como se describe aquí. La administración de un agente profiláctico puede ocurrir antes de la manifestación de los síntomas característicos de la aberración, tal que se impide una enfermedad o trastorno o, alternativamente, se retrasa su progreso. Dependiendo del tipo de aberración, por ejemplo, un agente agonista o antagonista puede ser usado para tratar el tema. El agente apropiado puede determinarse basándose en matrices de selección descritos en el presente documento.

2. Métodos terapéuticos

Otro aspecto de la descripción se refiere a métodos para modular la expresión o actividad de gen relacionada con el producto o gen CU para fines terapéuticos. El método modulador de la descripción implica poner en contacto una célula con un agente que modula una o más de las actividades del polipéptido. Un agente que modula la actividad puede ser un agente como se describe en el presente documento, tal como un ácido nucleico o una proteína, un ligando afín de origen natural del polipéptido, un péptido, un peptidomimético, u otra molécula pequeña. En una realización, el agente estimula una o más de las actividades biológicas del polipéptido. En otra realización, el agente inhibe una o más de las actividades biológicas del polipéptido producto génico o gen relacionado con CU. Ejemplos de tales agentes inhibidores incluyen moléculas antisentido de ácido nucleico y los anticuerpos y otros métodos descritos en este documento. Estos métodos moduladores se pueden realizar in vitro (por ejemplo, cultivando la célula con el agente) o, alternativamente, in vivo (por ejemplo, administrando el agente a un sujeto). Como tal, la presente descripción proporciona métodos de tratamiento de un individuo que padece de una enfermedad o trastorno caracterizado por la expresión o actividad aberrante de un polipéptido de productos de genes relacionados con CU. En una realización, el método implica la administración de un agente (por ejemplo, un agente identificado por una matriz de selección descrito en el presente documento), o combinación de agentes que modulan (por ejemplo, regulan hacia arriba o hacia abajo) la expresión o actividad. La inhibición de la actividad es deseable en situaciones en las que la actividad o la expresión es anormalmente alta o regulada hacia arriba y/o en la que es probable que la disminución de la actividad tenga un efecto beneficioso.

Ejemplo 1: Recogida de muestras y análisis Pacientes

Veintitrés biopsias obtenidas en la semana 0 se analizaron a partir de un subgrupo de 22 pacientes que recibieron infliximab (IFX) 5 o 10 mg/kg (11 biopsias de 10 pacientes que no responden y 12 biopsias de 12 respondedores, dos de las biopsias no respondedores fueron obtenidas en dos semanas a partir del mismo sujeto). El ARN mensajero se aisló a partir de biopsias de preinfliximab, etiquetadas y hibridadas a Affymetrix HGU133Plus_2.0 matriz. La firma de respuesta predictiva fue verificada por un conjunto de datos independientes. El diseño de la matriz de ACT1 (ClinTrials.gov Identificador NCT00036439), incluidos los criterios de elegibilidad de los pacientes, la asignación al azar, y los procedimientos de prueba se han descrito anteriormente en detalle.

Las biopsias se recogieron en puntos de tiempo de protocolo especificado de un subconjunto de pacientes asignados al azar ACT1. Todas las biopsias fueron recogidas de acuerdo con el Reglamento del Consejo de Revisión Institucional. El consejo de revisión institucional o consejo ético de cada centro aprobó el protocolo y todos los pacientes dieron su consentimiento informado.

La respuesta se determinó en la semana 8. La respuesta a infliximab se definió como curación completa de la mucosa (es decir, Mayo subpuntuación endoscópica de 0 o 1) y una calificación de 0 o 1 en el índice histológico de la CU. Los pacientes que no alcanzaron la curación de la mucosa fueron considerados no respondedores, aunque algunos pacientes mostraron una mejoría histológica. Las características basales de esta cohorte se presentan en la Tabla 1 a continuación.

Muestras de biopsia intestinal y preparación de ARN

Las biopsias se recogieron 15 a 20 centímetros distales del borde anal durante las endoscopias realizadas en la semana 0. Las biopsias fueron congeladas rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. El ARN total se aisló con mini kit RNeasy de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen Inc., Valencia, CA). Calidad y cantidad de ARN se analizaron con un 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA).

Una cohorte de validación independiente de las biopsias de 24 pacientes con CU tratados con infliximab se obtuvo del Hospital Universitario Gasthuisberg, Lovaina Bélgica. Las biopsias se obtuvieron dentro de una semana antes de la infusión intravenosa de 5 mg/kg de infliximab. Las biopsias se congelaron a -80°C antes de la elaboración para la expresión de ARNm. Se determinó la respuesta a infliximab en 4-6 semanas después de la infusión, con la respuesta se define como anteriormente. Las muestras de cohortes Lovaina se procesaron para aislamiento de mRNA y la hibridación utilizando los mismos métodos como se utilizaron para las muestras ACT1.

Hibridación de micromatrices

La hibridación de micromatrices se realizó en GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 matrices de acuerdo con el protocolo del fabricante (Affymetrix, Santa Clara, CA). Este chip permite analizar el nivel de expresión de más de 47.000 transcripciones y variantes, incluyendo 38.500 genes humanos bien caracterizados. Los chips fueron escaneados con un escáner GeneChip 3000, e intensidad de fluorescencia para cada característica de la matriz con GeneChip Operating Software versión 1.4 (Affymetrix, Santa Clara, CA).

Análisis de datos de micromatrices

Calidad de los datos fue evaluada por distribución de la intensidad de hibridación y de correlación de Pearson con Partek Genomic Suite 6.3 (Partek Inc., St. Charles, MO). Los coeficientes de correlación de Pearson variaron desde 0,80 hasta 1,0. La intensidad de los conjuntos de sonda se normalizó en todas las muestras utilizando GeneSpringGX 7,3 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

Las diferencias significativas entre las muestras no respondedoras y respondedoras infliximab fueron identificadas mediante análisis de la varianza (ANOVA) en el registro de 2 intensidades normalizadas transformadas. Se aplicó una tasa de falso descubrimiento 5% (FDR) para múltiples correcciones de pruebas. Se seleccionaron las transcripciones con más de 2 veces para la expresión diferencial a analizar la comparación. Para excluir la sonda fija que pasaron ANOVA y filtrado de cambio de pliegue, pero no se habían detectado en ambas condiciones de una comparación por parejas, sólo aquellas muestras designadas como "presentes" (detectadas) o "marginales" (detección limitada) al menos una vez entre las muestras que representan la condición se seleccionaron.

15 **Análisis de predicción de clases**

Clasificación de la capacidad de respuesta infliximab para cada muestra fue generada con el algoritmo de los "Vecinos K Más Cercanos" usando GeneSpring GX 7,3. Un clasificador que contiene las transcripciones que muestran expresión diferencial significativa entre los no respondedores (n=11 muestras) y la respuesta (n=12 muestras) antes del tratamiento con infliximab se evaluó por dejar una validación cruzada. Un valor p se calculó para medir la probabilidad de una muestra de prueba de ser clasificado por casualidad. La prueba exacta de Fisher se utilizó para seleccionar las transcripciones de predicción superior.

25 **Análisis de agrupamiento no supervisado**

Análisis de agrupación jerárquica se aplicó a los datos obtenidos del análisis de datos de micromatrices. La agrupación se ejecuta utilizando correlación de Pearson entre los perfiles de expresión de genes o dos pacientes para calcular la matriz de similitud en GeneSpringGX 7,3. Los resultados se visualizan como un mapa de calor dimensional 2 con dos dendrogramas (no mostrados), uno que indica la similitud entre los pacientes y el otro que indica la similitud entre los genes.

30 **Anotación funcional**

Análisis de enriquecimiento de anotación de genes se realizó utilizando Institutos Nacionales de Salud DAVID en línea (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). La significación estadística se determinó a través de la prueba exacta de Fisher. Categorías funcionales con un valor p de $\leq 0,05$ se consideraron significativos.

35 Firma de línea de base que diferencia respondedores de no respondedores

El perfil de expresión de biopsias de la mucosa en la semana 0 antes del tratamiento con infliximab se estableció a partir de 22 pacientes (11 biopsias de 10 no respondedores y 12 biopsias de 12 respondedores, dos de las biopsias de no respondedores fueron obtenidas dentro de dos semanas a partir del mismo sujeto) basándose en la respuesta a infliximab en la semana 8. Un total de 109 conjuntos de sonda, 102 regulados hacia arriba y 7 regulados hacia abajo, pasaron un FDR del 5% y un tope diferencial de doble pliegue que representa 90 genes.

Cuando se clasifican en los procesos biológicos, hubo un predominio de los procesos inmunes innatos. Los cinco procesos inmunes innatos más predominantes eran la respuesta de defensa, respuesta inmunitaria, transducción de señales, la respuesta a otros organismos, y la respuesta a las plagas, agentes patógenos o parásitos (Figura 1). Diez miembros del conjunto de sonda de las citocinas/quimiocinas o receptores de citoquinas/quimioquinas. Incluido en el conjunto de la sonda era CXCL8/interleuquina (IL)-8, una quimiocina quimiotáctica para los leucocitos neutrófilos polimorfonucleares (PMN). Los receptores para CXCL8/IL-8, CXCR1/IL-8RA y CXCR2/IL-8RB también estuvieron presentes. También estuvo presente CXCL11/I-TAC, un factor quimiotáctico que activa las células T y las células asesinas naturales. Por último, IL-1 β , IL-1RN, e IL-11, fueron todos regulados hacia arriba en más de cuatro veces al comparar no respondedores con respondedores.

55 Análisis de predicción de la clase de los respondedores y no respondedores

La prueba exacta de Fisher se utilizó para seleccionar los mejores conjuntos de sonda predictivos que distinguen a los no respondedores de respuesta dentro de los 109 conjuntos de sonda demostrados que se expresan diferencialmente en la semana 0. Un subconjunto de 20 conjuntos de sonda no respondedores y respondedores clasificados en la semana 0 (Tabla 2) con una exactitud general de 95,4% (21/22), sensibilidad de 91,7% (11/12 respondedores) y especificidad de 100% (10/10 no respondedores) (Tabla 2). Los genes implicados en la respuesta inmune (IL-1 β , TLR2, TREM1 y LILRA1), la transducción de señales (PDE4B, PBEF1 y FCN1) o vías de señalización de proteína receptora acoplada de proteína G (GPR109B, C5AR1 [C5R1] y FPRL1) se representaron. Ocho de estos 20 genes se expresaron por PMNs, los cuales están presentes en gran número en la mucosa del colon de pacientes con CU activa. La agrupación jerárquica del conjunto clasificador 20 de la sonda mostró una clara

separación entre los no respondedores y respondedores (no se muestra). Posteriormente se determinó el número mínimo de transcripciones que permitan una clasificación equivalente. Un clasificador que contiene tan sólo 5 conjuntos de sonda seleccionados de los 20 que aparecen arriba fue capaz de alcanzar una precisión global del 90,9% (20/22), sensibilidad del 91,7% (11/12 respondedores) y una especificidad del 90,0% (9/10 no respondedores) (Tablas 2 y 3). Los 5 genes obtenidos fueron BCL6, CREB5, C5AR1, FPRL1, y OSM. Tanto BCL6 como CREB5 tuvieron ligeramente mayor fuerza predictiva, mientras que los 3 genes restantes tenían una fuerza predictiva igual. Es de destacar que cualquiera de los 15 genes restantes podrían reemplazar C5AR1, FPRL1, y OSM sin ninguna pérdida en la calidad predictiva del clasificador de conjunto de sonda 5 (datos no mostrados). La agrupación jerárquica del clasificador de conjunto de sonda 5 a través de los 10 no respondedores y 12 respondedores mostraron una separación notable (no se muestra) con un perfil de expresión muy contrastada a través de los 5 conjuntos de sonda cuando se comparan pacientes no respondedores a los respondedores. El respondedor mal clasificados individual tenía un perfil de expresión muy similar a pacientes no respondedores con la excepción de CREB5. Finalmente, la Figura 2 muestra una representación gráfica de puntos del clasificador 5 genes usando las intensidades brutas normalizadas donde se ve una marcada diferencia para cada uno de los cinco genes al inicio del estudio comparando no respondedores con respondedores.

Validación de predicción de clase

Los clasificadores de conjunto de sonda 20 y 5 se validaron utilizando la cohorte de Lovaina como un conjunto de pruebas de validación independientes, constituidas por 16 pacientes no respondedores y 8 respondedores. Precisión global de 75% (18/24), sensibilidad de 87,5% (7/8 respondedores) y especificidades de 68,8% (11/16 no respondedores) se obtuvieron para ambos clasificadores. La agrupación jerárquica del conjunto clasificador 20 de la sonda entre los 16 pacientes no respondedores y 8 respondedores mostraron que los no respondedores mal clasificados 4 y el respondedor mal clasificado 1 tienen perfiles de expresión muy similares a los respondedores y no respondedores, respectivamente.

Estos conjuntos de sonda todos pasaron un FDR 5% y un corte de la expresión diferencial de dos veces. Dos firmas de respuesta de predicción, uno un conjunto de sonda 20 y uno de subconjunto 5 de los 20, fueron establecidos y verificados utilizando una cohorte independiente. Cuatro no respondedores se clasificaron mal, pero tenían patrones de expresión parecidos a la de los respondedores de los 109 genes diferencialmente expresados en la Semana 0 (datos no mostrados). Esto sugiere que estos pacientes son lentos para manifestar un beneficio clínico del tratamiento con infliximab o tienen factores que influyen en su respuesta clínica no evidente a través de la expresión de la mucosa de perfiles en la Semana 0. Un respondedor de la cohorte ACT1 fue incorrectamente clasificada por los clasificadores de conjunto de sonda 20 y 5, mientras que un respondedor en la cohorte de validación independiente fue clasificado erróneamente.

Utilidad de la firma de respuesta. La firma de respuesta para el tratamiento con infliximab en CU descrita en este documento puede ser evaluada y utilizada como se describe a continuación.

- 1) Muestras de biopsia colonoscópicas se obtienen de sitios lesionales de pacientes con CU activa (o la enfermedad de Crohn o enfermedades y trastornos relacionados). ARN a continuación se aisló de las muestras de biopsia y se sometió a análisis en tiempo real RT-PCR. Un microgramo de ARN total en el volumen de 50 µl se convierte en cADN en presencia de transcriptasa inversa MultiScribe (biosistema ABI, Foster City, California). La reacción se lleva a cabo mediante la incubación durante 10 minutos a 25°C seguido de 30 minutos a 48°C. Transcriptasa inversa se inactiva a 95°C durante 5 minutos. Veinticinco nanogramos de cADN por reacción se utilizan en PCR en tiempo real con ABI 7900 del sistema (Foster City, California). En presencia de polimerasa de ADN AmpliTaq Gold (biosistema ABI, Foster City, California), se incuba la reacción durante 2 minutos a 50°C seguidos de 10 minutos a 95°C. A continuación, la reacción se realiza durante 40 ciclos a 15 segundos, a 95°C y 1 minuto, 60°C por ciclo usando el cebador/ conjuntos específicos de sonda para los genes de la firma de respuesta. Genes de mantención, tales como GAPDH o actina, se utilizarán como calibradores internos. El cambio relativo en la expresión génica se calcula utilizando el método de Ct delta-delta descrito por Applied Biosystems utilizando los valores de las muestras no respondedoras como el calibrador o comparador.
- 2) Si un perfil de expresión génica similar cumple con los parámetros de la firma de perfil genético de un tipo de terapia, es decir, uno o más de la 5 o 20 genes de firma en los perfiles descritos anteriormente muestran niveles de expresión de predicción de respuesta en relación con no respondedores, el paciente es considerado un probable respondedor al tratamiento de la terapia. En cuyo caso, el paciente será tratado con la terapia.
- 3) Si el perfil de expresión génica no cumple con los parámetros de la firma de perfil genético para responder, es decir, nivel de expresión más bajo, entonces el paciente se define como un probable no respondedor al tratamiento. En cuyo caso, el paciente no puede ser tratado con la terapia. Esto permite que un paciente evite un tipo de terapia anteriormente, después de que se considere como no respondedor. Esto puede permitir que el paciente reciba un tipo de terapia diferente.

Método de comparación en relación a la referencia estándar:

El ARN total se va a analizar en una matriz de chips de genes para las intensidades de expresión del panel de 20 genes enumerados en la Tabla 2 o en el panel de 5 genes que aparece en negrita en la Tabla 2. Los siguientes procedimientos son ejemplos de un método de evaluación de los miembros de un panel de genes de la invención frente a un estándar de referencia con el fin de comparar los valores de los miembros de panel de 20 o 5 genes:

- 5 1. El ARN total se extrae de una muestra de biopsia de un paciente prospectivo CU (o trastorno relacionado) antes del tratamiento y la cantidad total de ARN y la calidad se evalúa como se especificó anteriormente en el Ejemplo 1.
- 10 2. El ARN total se realizó por duplicado en tres matrices de chips de genes idénticos separados, por ejemplo, matrices GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 como sigue:
 - a. Amplificación del ARN, síntesis de destino y etiquetado, hibridación de chip, lavado y tinción se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante, por ejemplo, Affymetrix, Santa Clara, CA.
 - 15 b. Los GeneChips son escaneados utilizando, por ejemplo, el escáner GeneChip 3000.
 - c. Los datos se analizan con, por ejemplo, GCOS 1,4 (Sistema Operativo GeneChip) utilizando la configuración por defecto de análisis de Affymetrix y de escala global como método de normalización, con el objetivo de intensidad media recortada de cada matriz fijada arbitrariamente a 500.
 - d. La calidad de los datos se determina mediante la correlación de los datos de cada gen entre los duplicados y a lo largo de las tres matrices.
 - 20 a. Un coeficiente de correlación > 0,9 debería alcanzarse.
 - e. Un valor de intensidad medio se calcula con un error estandar que representa la variabilidad.
 - f. El paciente debe responder al tratamiento con un anticuerpo anti-TNF α (por ejemplo, infliximab) si:
 - i. El valor de intensidad medio es igual o superior a X para cada conjunto de sonda de genes (Tabla 2); o
 - 25 b. El valor de intensidad medio para el panel genético de cinco (o 20) es igual o superior a X (Tabla 2).
 - g. El paciente no debe responder al tratamiento de anticuerpo anti-TNF α (por ejemplo, infliximab) si:
 - i. El valor medio de intensidad está por debajo de Y para cada conjunto de sonda de genes (Tabla 2); o
 - ii. El valor medio de intensidad para el panel genético de cinco (o 20) está por debajo de Y (Tabla 2).

Tabla 1. Características basales de las cohortes del estudio

Características	Cohorte de ACT1	
	Respondedores	No Respondedores
	(n=12)	(n=10)
Varón/Mujer	6-Jun	6-Abr
Edad mediana en línea de base (años)	39,0 (29-70)	51,5 (24-68)
Peso mediano en línea de base (kg)	75 (63,0-159,0)	69,0 (46,0-102,0)
Duración mediana de enfermedad en línea de base (años)	5,9(1,6-42,1)	5,7 (2,9-26,8)
Proteína mediana C-reactiva en línea de base (mg/dL)	0,7 (0,2-2,9)	1,35 (0,2-6,8)
Medicación concomitante en línea de base		
5-Aminosalicilatos	1	1
55 Corticoesteroides	8	6
Azatioprina/6-Mercaptopurina	2	3
Corticoesteroides + Inmunosupresores	0	0
60 Fumar activamente en línea de base	1	0

5

Tabla 2: Clasificador de conjunto de sonda de línea de base IFX

	Conjunto de prueba ID	de	Ratio NR vs. R	Nombre (SEQ ID NO)	GenBank Acc No
10	205220_at		11,1	GPR109B (SEQ ID NO:1)	NM_006018
	219434_at		9,3	TREM1 (SEQ ID NO:2)	NM_018643
15	230170_at		8,6	OSM (SEQ ID NO:3)	A1079327
	213524_s_at		7,7	G0S2 (SEQ ID NO:4)	NM_015714
	210773_s_at		7,1	FPRLI (SEQ ID NO:5)	U81501
20	236439_at		6,5	No conocido (SEQ ID NO:6)	A1733564
	215671_at		6,3	PDE4B (SEQ ID NO:7)	AU 144792
25	243296_at		5,1	PBEF1 (SEQ ID NO:8)	AA873350
	228758_at		5,0	BCL6 (SEQ ID NO:9)	AW264036
	232555_at		4,6	CREB5 (SEQ ID NO:10)	A1689210
30	39402_at		4,3	11-1B (SEQ ID NO:11)	M15330
	1553297_a_at		4,3	CSF3R (SEQ ID NO:12)	NM_172313
35	204924_at		4,0	TLR2 (SEQ ID NO:13)	NM_003264
	220088_at		3,7	C5AR1 (C5R1) (SEQ ID NO:14)	NM_001 736
40	205237_at		3,5	FCN1 (SEQ ID NO:15)	NM_002003
	1555643_s_at		3,5	LILRA5 (LIR9) (SEQ ID NO:16)	AF499918
45	211806_s_at		3,3	KCNJ1S (SEQ ID NO: 17)	D87291
	208438_s_at		2,6	FGR (SEQ ID NO:18)	NM_005248
	211100_x_at		2,5	LILRA1 (SEQ ID NO:19)	U82278
50	215966_x_at		2,4	GK3P (GK) (SEQ ID NO:20)	AA292874

55

60

65

5

Tabla 3: Características de firmas predictiva IFX de línea de base

10	Parámetros	20 firma de conjunto de sonda		5 firma de conjunto de sonda	
		Conjunto de prueba	Conjunto de validación	Conjunto de prueba	Conjunto de validación
	R	12	8	12	8
15	Predicciones correctas	11	7	11	7
	NR	11	16	11	16
20	Predicciones correctas	11	11	10	11
	Sensibilidad	91,7%	87,5%	91,7%	87,5%
25	Especificidad	100,0%	68,8%	90,9%	68,8%
	Corrección general	95,7%	75,0%	91,3%	75,0%

30

Tabla 3: Características de firmas predictiva IFX de línea de base

35	Parámetros	20 firma de conjunto de sonda		5 firma de conjunto de sonda	
		Conjunto de prueba	Conjunto de validación	Conjunto de prueba	Conjunto de validación
	R	12	8	12	8
40	Predicciones correctas	11	7	11	7
	NR	11	16	11	16
45	Predicciones correctas	11	11	10	11
	Sensibilidad	91,7%	87,5%	91,7%	87,5%
50	Especificidad	100,0%	68,8%	90,9%	68,8%
	Corrección general	95,7%	75,0%	91,3%	75,0%

55

60

65

Tabla 4 - Genes diferencialmente regulados de línea de base comparando respondedores y no respondedores

	Conjunto de sonda ID	Ratio NR vs. R	Nombre	GenBank Acc No
5	206924_at	15, 6	IL11	NM_000641
	215078_at	14, 7	SOD2	AL050388
10	229947_at	13, 7	No conocido	AI088609
	207094_at	13, 5	IL8RA	NM_000634
	205220_at	11, 1	GPR109B	NM_006018
15	232629_at	9, 9	PROK2	AF182069
	211506_s_at	9, 8	IL8	AF043337
	210119_at	9, 5	KCNJ15	U73191
	1554997_a_at	9, 4	PTGS2	AY151286
20	219434_at	9, 3	TREM1	NM_018643
	230170_at	8, 6	OSM	AI079327
	204748_at	8, 1	PTGS2	NM_000963
	213524_s_2t	7, 7	G0S2	NM_015714
25	210773_s_2t	7, 1	FPRLI	U81501
	214637_at	7, 0	OSM	BG4370 34
	205568_at	6, 7	AQP9	NM_020980
30	236439_at	6, 5	No conocido	AI733564
	206025_s_at	6, 3	TNFAIP6	AW188198
	215671_at	6, 3	PDE4B	AU144792
	207008_at	6, 1	IL8RB	NM_001557
35	203591_s_at	5, 9	CSF3R	NM_000760
	234644_x_at	5, 8	No conocido	AK026079
	206881_s_at	5, 8	LILRA3	NM_006865
	229967_at	5, 8	CKLFSF2	AA778552
40	206522_at	5, 8	MGAM	NM_004668
	236495_at	5, 7	No conocido	AI681868
	206026_s_at	5, 6	TNFAIP6	NM_007115
45	205119_s_2t	5, 5	FPR1	NM_002029
	210873_x_at	5, 5	APOBEC3A	U03891
	203470_s_2t	5, 4	PLEK	AI4335 95
	1554676_at	5, 3	PRG1	BC022313
50	204007_at	5, 3	FCGR3A	J04162
	243296_at	5, 1	PBEF1	AA873350
	205681_at	5, 1	BCL2A1	NM_004049
	210772_at	5, 1	FPRL1	M88107
55	228758_at	5, 0	BCL6	AW264036
	212657_s_at	4, 9	IL1RN	U65590
	230746_s_at	4, 9	STC1	AW003173
60	207275_s_at	4, 8	ACSL1	NM_001995
	205067_at	4, 7	ILIB	NM_000576
	232555_at	4, 6	CREB5	A16892 10

65

ES 2 581 774 T3

	204006_s_at	4, 6	FCGR3A	NM_000570
	212942_s_at	4, 6	KIAA1199	AB0330 25
	210004_at	4, 6	OLR1	AF0357 76
5	216243_s_at	4, 5	ILI RN	BE5634 42
	204959_at	4, 5	MNDA	NM_00 2432
	39402_at	4, 3	ILIB	M1533 0
	1553297_a_at	4, 3	CSF3R	NM_172313
	201963_at	4, 3	ACSL1	NM_021122
10	212659_s_at	4, 0	ILI RN	AW083 357
	204924_at	4, 0	TLR2	NM_003264
	211163_s_at	4, 0	TNFRSF10C	AF012536
	204596_s_at	3, 9	STC1	U46768
	229723_at	3, 9	TAGAP	BF5910 40
15	204932_at	3, 8	TNFRSF11B	BF4339 02
	220088_at	3, 7	C5RI	NM_001736
	205237_at	3, 5	FCN1	NM_002003
	1555643_s_at	3, 5	LIR9	AF499918
	229770_at	3, 4	FLJ31978	AI041543
20	214511_x_at	3, 4	FCGR1A	L03419
	210163_at	3, 4	CXCL11	AF030514
	206222_at	3, 4	TNFRSF10C	NM_003841
	213425_at	3, 4	WNT5A	AI968085
	216950_s_at	3, 4	FCGR1A	X14355
25	224941_at	3, 4	PAPPA	BF107618
	220404_at	3, 3	GPR97	NM_014076
	206515_at	3, 3	CYP4F3	NM_000896
	204933_s_at	3, 3	TNFRSF11B	NM_002546
	205118_at	3, 3	FPR1	M60626
30	211806_s_at	3, 3	KCNJ15	D87291
	211122_s_at	3, 2	CXCL11	AF002985
	204597_x_at	3, 1	STC1	NM_003155
	203140_at	3, 1	BCL6	NM_001706
35	204595_s_at	3, 1	STC1	A130052 0
	204422_s_at	2, 9	FGF2	NM_002 006
	225987_at	2, 8	FLJ23153	AA65028 1
	205990_s_at	2, 7	WNT5A	NM_003392
	208438_s_at	2, 6	FGR	NM_005248
40	201858_s_at	2, 6	PRG1	J03223
	210484_s_at	2, 6	TNFRSF10C	BC00504 3
	232224_at	2, 6	MASP1	A127409 5
	208594_a_at	2, 6	ILT8	NM_024318
	205100_at	2, 5	GFPT2	NM_005110
45	240862_at	2, 5	RASGRP4	AA923524
	202388_at	2, 5	RGS2	NM_002923
	219788_at	2, 5	PILRA	NM_013439
	211100_x_at	2, 5	LILRA1	U82278
	224341_x_at	2, 4	TLR4	U93091
50	215966_x_at	2, 4	GK	AA292874
	201041_s_at	2, 4	DUSP1	NM_004417
	215977_x_at	2, 4	GK	X68285
	205896_at	2, 3	SLC22A4	NM_003059
	228501_at	2, 3	GALNTL2	BF055343
55	211133_x_at	2, 3	LILRB3	AF009643
	217167_x_at	2, 2	GK	AJ252550
	211546_x_at	2, 2	SNCA	L36674
	210664_s_at	2, 1	TFPI	AF021834
	209960_at	2, 1	HGF	X16323
60	219859_at	2, 0	CLECSF9	NM_014358
	201315_x_at	2, 0	IFITM3	NM_006435
	212281_s_at	-2, 0	MAC30	BF038366
	211541_s_at	-2, 4	DYRK1A	U52373
65	227491_at	-2, 4	No conocido	AA777752

	235109_at	-2,8	ZBED3	AI887983
	205523_at	-2,8	HAPLN1	U43328
	232054_at	-5,3	PCDH20	AA040057
5	229831_at	-5,8	CNTN3	BE221817

Referencias

10

1. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, et al. Infliximab for Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis 2005. *N Engl J Med* 2005;353:2462-2476.
- 15 2. Geboes K, Riddell R, Ost A, et al. Reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis. *Gut* 2000; 47:404-409.
3. Bermejo S, Cabestany J. Adaptive soft k-nearest-neighbour classifiers. *Pattern Recog* 2000;33:1999-2005.
4. Liu Y, Shaw SK, Ma S, et al. Regulation of leukocyte transmigration: cell surface interactions and signalling events. *J Immunol* 2004;172:7-13.
- 20 5. Ben-Baruch A, Michiel DF, Oppenheim JJ. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J Biol Chem* 1995;270:11703-11706.
6. Greenberg S, Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2002;14:136-145.
7. Izzo RS, Witkon K, Chen AI, et al. Interleukin-8 and neutrophils markers in colonic mucosa from patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1992;87:1447-1452.
- 25 8. Al-Sadi R, Ye D, Dokladny K, Ma TY. Mechanism of IL-1 β -induces increase in intestinal epithelial tight junction permeability *J Immunol*. 2008;180:5653-5661.
9. Guo R-F, Riedemann NC, Ward PA. Role of C5a-C5ar interaction in sepsis. *Schock* 2004; 21:1-7.
10. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003-102-.2660-2669.
- 30 11. Frolova L, Drastich P, Rossmann P, et al. Expression of Toll-like Receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in Biopsy Samples of Patients With Inflammatory Bowel Diseases: Upregulated Expression of TLR2 in Terminal Ileum of Patients With Ulcerative Colitis, *J Histochem Cytochem* 2008;56:267-274.
- 35 12. Hart AI, Al-Hassi HO, Rigby RJ, et al. Characteristics of Intestinal Dendritic Cells in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 2005; 129:50-65.
13. Banks C, Bateman A, Payne R, et al. Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohns disease. *J Pathol* 2003;199:28-35.
- 40 14. Yamamoto T, Umegae S, Kitagawa T, et al. Systemic and local cytokine production in quiescent ulcerative colitis and its relationship to future relapse: a prospective pilot study. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:589-596.
15. Ramos CD, Heluy-Neto NE, Ribeiro RA, et al. Neutrophil migration induced by IL-8 activated mast cells is mediated by CINC-1. *Cytokine* 2003;21:214-223.
- 45 16. Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, et al. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type. *Inflamm Nat Genet* 1997;16:161-70.
17. Kusam S, Toney LM, Sato H, et al. Inhibition of Th2 differentiation and GATA-3 expression by BCL-6. *J Immunol* 2003;170:2435-41.
18. Klein W, Tromm A, Griga T, et al. A polymorphism in the IL1 gene is associated with ulcerative colitis. *Genes Immun* 2002;3:494-496.
- 50 19. Balding J, Livingstone WJ, Conroy J, et al. Inflammatory bowel disease: the role of inflammatory cytokine gene polymorphisms. *Med Inflamm* 2004;13:181-187.
20. Brun P, Castagliuolo I, Leo VD, et al. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292:G518-G525.
- 55 21. Al-Sadi, RM, Ma TY. IL-1 b causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J. Immunol*. 2007;178:4641-4649.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 60 <110> CENTOCOR ORTHO BIOTECH INC.
- <120> Marcadores y métodos de evaluación y tratamiento de colitis ulcerosa y trastornos relacionados mediante un panel de 20 genes
- 65 <130> CEN5230PCT

<140> SERÁ ASIGNADO
 <141> 2009-08-28

5 <150> 61/092966
 <151> 2008-08-29

<160> 20

10 <170> FastSEQ para Windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 553
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 1

```

gatctacttg tgacttggtg gccttcttcc cacatctgcc tcagactggg gggggctcag 60
ctcctcgggt gatatctagc ctgcttgtga gctctagcag ggataaggag agctgagatt 120
ggaggggaatt gtggtgctcc tggaggaagc ccaggcatca ttaaacaagc cagtaggtca 180
cctggcttcc gtggaccaat tcatctttca gacaagcttt agagaaatgg actcagggaa 240
gagactcaca tgctttgggt agtatctgtg tttccgggtg gtgtaatagg ggattagccc 300
cagaagggac tgagctaaac agtggtatta tgggaaagga aatggcattg ctgctttcaa 360
25 ccagcgacta atgcaatcca ttcctctctt gtttatagta atctaagggt tgagcagtta 420
aaacggcttc aggatagaaa gctgtttccc acctgtttcg ttttaccatt aaaagggaaa 480
cgtgcctctg cccacgggtg agaggggggtg cacgttcttc ctggttctct cgcttgtggt 540
tctgtactta cca 553
    
```

30 <210> 2
 <211> 467
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

35 <400> 2

```

ccatgatcat ggtttactgc gcgtccgaat ggtcaacctt caagtggaag attctggact 60
gtatcagtggt gtgatctacc agcctcccaa ggagcctcac atgctgttcg atcgcatccg 120
40 cttgggtggtg accaagggtt tttcagggac ccctggctcc aatgagaatt ctaccagaa 180
tgtgtataag attcctccta ccaccactaa ggcttctgtc ccactctata ccagccccag 240
aactgtgacc caagctccac ccaagtcaac tgccgatgct tccactctg actctgaaat 300
caaccttaca aatgtgacag atatcatcag ggttccggtg ttcaacattg tcattctcct 360
ggctggtgga ttcctgagta agagcctggt cttctctgtc ctggttctctg tcacgctgag 420
45 gtcatttgta ccctaggccc acgaaccac gagaatgtcc tctgact 467
    
```

50 <210> 3
 <211> 307
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

55 <220>
 <221> desconocida
 <222> (60)
 <223> donde n puede ser representada por a, c, t, o g

<400> 3

60

65

ES 2 581 774 T3

5 agttagaggc tgtacaaggc ccccaactgcc tgtcggttgc ttggattccc tgacgtaagn 60
 tggatattaa aaatctgtaa atcaggacag gtggtgcaaa tggcgctggg aggtgtacac 120
 ggaggtctct gtaaaagcag acccacctcc cagcgccggg aagcccgtct tgggtcctcg 180
 ctgctggctg ctccccctgg tgggtgatcc tggaattttc tcacgcagga gccattgctc 240
 tcctagaggg ggtctcagaa actgcgaggc cagttccttg gagggacatg actaatttat 300
 cgatttt 307

10 <210> 4
 <211> 503
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <220>
 <221> desconocida
 <222> (419)
 <223> donde n puede ser representada por a, c, t, o g

20 <400> 4

25 gtgctcggcc tgatggagac tgtgtgcagc cccttcacgg ccgccagacg tctgcgggac 60
 caggaggcag ccgtggcggg gctgcaggcc gccctggagc gacaggctct ccagaagcaa 120
 gccctgcagg agaaaggcaa gcagcaggac acggtcctcg gggccggggc cctgtccaac 180
 cggcagcacg cctcctagga actgtgggag accagcggag tgggagggag acgcagtaga 240
 cagagacaga ccgagaagga agggagagac agagggggcg cgcgcacagg agcctgactc 300
 cgctgggaga gtgcaggagc acgtgctgtt ttttatttgg acttaacttc agagaaaccg 360
 ctgacatcta gaactgacct accacaagca tccaccaaag gagtttggga ttgagttnt 420
 30 gctgctgtgc agcactgcat tgtcatgaca tttccaacac tgtgtgaatt atctaaatgc 480
 gtctaccatt ttgcactagg gag 503

35 <210> 5
 <211> 542
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40 <400> 5

45 tttcctcttt ttgactacag taactattcc aatgggggac acatactgta ctttcaactt 60
 tgcattcctgg ggtggcacc ctaggagag gctgaagggt gccattacca tgctgacagc 120
 cagagggatt atccggtttg tcattggctt tagcttgccg atgtccattg ttgccatctg 180
 ctatgggctc attgcagcca agatccacaa aaagggcatg attaaatcca gccgtccctt 240
 acgggtcctc actgctgtgg tggcttcttt ctccatctgt tggtttcctt ttcaactggt 300
 tgcccttctg ggcaccgtct ggctcaaaga gatgttgttc tatggcaagt acaaaatcat 360
 tgacatcctg gtaacccaa cgagctccct ggccttcttc aacagctgcc tcaacccat 420
 gctttacgtc tttgtgggccc aagacttccg agagagactg atccactccc tgcccaccag 480
 50 tctggagagg gccctgtctg aggactcagc cccaactaat gacacggctg ccaattctgc 540
 tt 542

55 <210> 6
 <211> 229
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

60 <400> 6

65 cccacaacc gccaggattt aatcttttat ggattttttt ttcagtttat agtttccagg 60
 aggaaagtct tgtaacgctt tactttttct cttctttttt taaagtaaag tgagtgtcag 120
 tagatgtgtt ttttacagtc tggattttta aaaaagtggg gcaggagaga gggaaaccagg 180
 gaaagggctg tttagaata cagtttgtgg ctctgagcga tgccaccgg 229

ES 2 581 774 T3

<210> 7
 <211> 294
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <221> desconocida
 <222> (45) (53) (62) (77) (84)

10

<400> 7

```

gaatatgcag caatggaaag tatcagtatc catacaaaga ttttncaaga aancgaatgg 60
gntgagccaa gtagctngag atnagaatg agttcataga ctgtccaaga tctttatccc 120
aaaaacattt ggattgttta ttttcagtat ttatcctctt tccctactac ctggatactc 180
caaatTTGca tatacttGta atattaatat acagttcctt tgcaatatTT attttGttgc 240
ttcttagaga aacccaacta aatgagttta aaaaatctgt gaaagggctg ggca 294
  
```

<210> 8
 <211> 432
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20

<400> 8

25

```

aagtGcttca agtattagtt gtcatattaa tccaagagaa aattagatct gagactacct 60
cgaggagtaa acgaacaact tctttaaac aatactagtc aaaatgcagt ccacggacca 120
atgctggttc atgccctatt tgatccaagt ccacattaag tacagaaatg aagagtaagc 180
atTTagaAAC ttggggcaat ttgacattgc ctcaacatcc aagtttcagt gtcctttata 240
aactattgat ccatgacaga tcatgaaact ttctaaaaat tgatcctttt atcacatagt 300
ctttcaaaat attatttGct tctttgaagc tttggataga aacttgataa tgtgaagttc 360
tctgctatgt ggacctggTg tgcttatctt ctttGttgct gatttgagag ctgagctatg 420
tactatatct gg 432
  
```

30

35

<210> 9
 <211> 569
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40

<220>
 <221> desconocida
 <222> (120) (180) (395) (413) (416) (417)

45

<400> 9

```

tggggGcCct atgatggaga ccctcagccc ctagggactc catcttttga ccttgaagtc 60
tcgctcaaac attcccctaa aagaacgggg gtgagggaga atggaaggca aaaagagngn 120
aaaaagcaaa taaacttcgg aatcggacaa cttaaagtct cgatatgagc ctCGgattgn 180
attcgaactc ctgggttcta gaccagctc tgctactaac ttgtctgacc ttccccattt 240
ataaactgtt gtgggtgaga ggtgggacta ggtgaactct gagagccctg cactcggcgc 300
ggacgaggga tttaggggaa agtgtgctgt attccccgcg agccttcccc agcggccccg 360
cctccccggg tgaatccccg gcggccagcg cagcncaggc agcgatcctg gcngcncccg 420
gggcccgcag cttcctggaa agttacttct tgttggagcc ggcaataggc aaagtgtgtt 480
ctgtgaaatc cgcagagccg agattgacta cgttccggga atgagagggc tgtgtcattc 540
ccctcattgc ctgctgcatt gacggcgta 569
  
```

50

55

60

<210> 10
 <211> 456
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

65

<220>
 <221> desconocida

ES 2 581 774 T3

<222> (38) (52) (54) (56) (64) (69) (79) (82) (86) (88) (95) (99) (104) (116)
 <223> donde n puede ser representada por a, c, t, o g

<400> 10

5
 actgcagcaa actttctagc atctgatatt ggataagnat agcttgtgct anangntgga 60
 gatnaatcng gtctgctgnc tngcancntt agagnctgna tctnatggtt ggtgtnagga 120
 tgttgttgac agttctgaaa gttagccatc aattcctgtg caggggtggag tcagaccag 180
 10 tgacttcctt ttcaatgtca gcaagagttt tctcatgcct gctttggtea ctttctcttg 240
 gaaacttcac gcatttgact tgcagcttct tgacccgagg aatcaactga gctcccagtg 300
 ctggctacct tgggcaaata aaatctgtgg ttgagagagt tctctttgct gtgccacagt 360

15
 ccctgtgatg tgccaaatgg caccagcatt tgcagcaaag ctcgttaaat ctttttggaa 420
 tgggcaaata ttttttcaac ttgagccctg ctgagc 456

20
 <210> 11
 <211> 550
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25
 <220>
 <221> desconocida
 <222> (51) (123)...(139) (272) (273) (274) (301)...(369)
 <223> donde n puede ser representada por a, c, t, o g

30
 <400> 11

35
 aatgtggact caatccctag ggctggcaga aagggaaacag aaagggtttt nagtacggct 60
 atagcctgga ctttctgtt gtctacacca atgcccaact gcctgcctta gggtagtgct 120
 aannnnnnnn nnnnnnnnnc agccaggaca gtcagctctc tcctttcagg gccaatcccc 180
 agcccttttg ttgagccagg cctctctcac ctctctact cacttaaagc ccgcctgaca 240
 gaaaccacgg ccacatttgg ttctaagaaa cnnnctctg tcattcgctc ccacattctg 300
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 360
 40 nnnnnnnnna agggggcaag aagtagcagt gtctgtaaaa gagcctagtt ttaatatagct 420
 atggaatcaa ttcaatttgg actgggtgtgc tctctttaa tcaagtcctt taattaagac 480
 tgaaaatata taagctcaga ttattttaat ggggaatatt ataatgagc aaatatcata 540
 ctgttcaatg 550

45
 <210> 12
 <211> 519
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

50
 <220>
 <221> desconocida
 <222> (325)...(331)
 <223> donde n puede ser representada por a, c, t, o g

55
 <400> 12

60
 aacagtacag tcctcacctt gatgacctg accccagagg ggtcggagct acacatcatc 60
 ctgggcctgt tgggctcctt gctgttgctc acctgcctct gtggaactgc ctggctctgt 120
 tgcagcccca acaggaagaa tcccctctgg ccaagtgtcc cagaccagc tcacagcagc 180
 ctgggctcct ggggtgccac aatcatggag gaggatgcct tccagctgcc cggccttggc 240
 acgccacca tcaccaagct cacagtgtct gaggaggatg aaaagaagcc ggtgccctgg 300
 gagtcccata acagctcaga gaccnnnnn ntccccactc tgggtccagac ctatgtgctc 360
 cagggggacc caagagcagt ttccaccag ccccaatccc agtctggcac cagcgatcag 420
 gctgggcctc ccaggcgatc tgcatactt aaggaccaga tcatgctcca tccagcccca 480
 65 cccaatggcc ttttgtgctt gtttcctata acttcagta 519

ES 2 581 774 T3

<210> 13
 <211> 462
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 13

	gtttcttaca	gtgagcggga	tgcctactgg	gtggagaacc	ttatgggtcca	ggagctggag	60
	aacttcaatc	cccccttcaa	gttgtgtctt	cataagcggg	acttcattcc	tggcaagtgg	120
10	atcattgaca	atatcattga	ctccattgaa	aagagccaca	aaactgtctt	tgtgctttct	180
	gaaaactttg	tgaagagtga	gtgggtgcaag	tatgaactgg	acttcctcca	tttccgtctt	240
	tttgaagaga	acaatgatgc	tgccattctc	attcttctgg	agcccattga	gaaaaaagcc	300
	attccccagc	gcttctgcaa	gctgcggaag	ataatgaaca	ccaagacctt	cctggagtgg	360
15	cccatggacg	aggctcagcg	ggaaggattt	tgggtaaadc	tgagagctgc	gataaagtcc	420
	taggttccca	tatttaagac	cagtctttgt	ctagttggga	tc		462

<210> 14
 <211> 340
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20

<400> 14

25	attatgcttt	ctattttgag	atcattgcaa	actcaacaca	attgtaagta	atgatacaga	60
	gggatcttgt	gtacccttca	cccagcctcc	cccaatggca	acatcttgca	aaactacaat	120
	gtagtctcat	aaccaggata	ttgacattga	tacagtgaag	atacaggaca	ttctcatcac	180
	cacagggatc	cccaggatgc	ccacttccct	ccacccccac	accccagccg	tgtccctaac	240
30	ccctggcaac	caggaatcca	ctctccattt	ctataatggt	gtcatttcaa	gaatgttatt	300
	caatggaatc	atatagtatg	taacctgttt	tgagcttaaa			340

<210> 15
 <211> 418
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

35

<400> 15

40	gagggcaacc	accagtttgc	taagtacaaa	tcattcaagg	tggctgacga	ggcagagaag	60
	tacaagctgg	tactgggagc	ctttgtcggg	ggcagtgcgg	gtaattctct	aacggggccac	120
	aacaacaact	tcttctccac	caaagaccaa	gacaatgatg	tgagttcttc	gaattgtgct	180
	gagaagtcc	agggagcctg	gtggtacgcc	gactgtcatg	cttcaaacct	caatggctctc	240
45	tacctcatgg	gaccccatga	gagctatgcc	aatggatca	actggagtgc	ggcgaagggg	300
	tacaaatata	gctacaaggt	gtcagagatg	aaggtgcggc	ccgcctagac	gggccaggac	360
	ccctccacat	gcacctgcta	gtggggaggc	cacaccacac	agcgctgcgt	cgtggaag	418

<210> 16
 <211> 349
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

50

<400> 16

55	ataccgctgt	tactactaca	gccctgcagg	ctggtcagag	cccagcgacc	ccctggagct	60
	ggtggtgaca	ggattctaca	acaaaccac	cctctcagcc	ctgcccagtc	ctgtggtgac	120
	ctcaggagag	aacgtgacct	tccagtgtgg	ctcacggctg	agattcgaca	ggttcattct	180
60	gactgaggaa	ggagaccaca	agctctctctg	gaccttgagc	tcacagctga	ccccagtgag	240
	gcagttccag	gccctgttcc	ctgtggggcc	tgtgaccccc	agccacaggt	ggatgctcag	300
	atgctatggc	tctcgcaggc	atatcctgca	ggtatggtca	gaaccagct		349

<210> 17
 <211> 479
 <212> ADN

65

ES 2 581 774 T3

<213> Homo sapiens

<400> 17

```

5   gtgcagtcac  caccaagcag  aatgggaagc  tgtgcttggt  gattcaggta  gccaatatga  60
   ggaagagcct  cttgattcag  tgccagctct  ctggcaagct  cctgcagacc  cacgtcacca  120
   aggaggggga  gcggattctc  ctcaaccaag  ccactgtcaa  attccacgtg  gactcctcct  180
   ctgagggccc  cttcctcatt  ctgcccataa  cattctacca  tgtgctggat  gagacgagcc  240
10  ccctgagaga  cctcacaccc  caaaacctaa  aggagaagga  gtttgagctt  gtggtcctcc  300
   tcaatgccac  tgtggaatcc  accagcgtg  tctgccagag  ccgaacatct  tatatcccag  360
   aggaaatcta  ctggggtttt  gagtttgtgc  ctgtggtatc  tctctccaaa  aatggaaaat  420
   atgtggctga  tttcagtcag  tttgaacaga  ttcggaaaag  cccagattgc  acattttac  479

```

15 <210> 18
 <211> 285
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 18

```

   aagtgtcag  accttgtcta  gttatttata  aactgtatgt  acctccctca  cttctctcct  60
   atcactgttt  tcctactctc  cttttatctc  actctagtcc  aggtgccaa  aatttccctt  120
   ctaccctcta  ttctcttggt  tctgtaagtt  acaaagtcag  gaaaagtctt  ggctggacc  180
25  ctttctgct  ggggtggatg  agtgggtccag  gactggggtc  tgggccagg  tttgagggag  240

```

```

30   aagtttgcag  agcacttccc  acctctctga  atagtgtgta  tgtgt  285

```

<210> 19
 <211> 478
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 19

```

40  cccctggac  atcctgatca  caggacagtt  ctatgacaga  ccctctctct  cgggtgcagcc  60
   ggtccccaca  gtgagcccag  gaaagaacgt  gaccctgctg  tgtcagtcac  gggggcagtt  120
   ccacactttc  cttctgacca  aggagggggc  aggccatccc  ccactgcac  tgagatcaga  180
   gcaccaagct  cagcagaacc  aggctgaatt  ccgcatgggt  cctgtgacct  cagcccacgt  240
   tgggacctac  agatgctaca  gctcactcag  ctccaacccc  tacctgtgt  ctctccccag  300
45  tgacccccctg  gagctcgtgg  tctcagaagc  agctgagacc  ctgagccat  cacaaaacaa  360
   gagagactcc  acgactacat  ccctagggca  acacccccag  gattacacag  tggagaatct  420
   catccgcatg  ggtgtggctg  gcttggctct  ggtggctctc  gggattctgc  tatttgag  478

```

50 <210> 20
 <211> 437
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

55 <220>
 <221> desconocida
 <222> (186) (199) (205) (217) (338) (353) (375) (376) (399)

<400> 20

```

60  ggatgccatg  aatcgagact  gtggaattcc  actcagtcac  ttgcaggttg  atggaggaat  60
   gaccagcaac  aaaattctta  tgcagctaca  agcagacatt  ctgtatattc  cagtagtgaa  120
   gcccttgatg  cccgaaacca  ctgcactggg  tgcctgcatg  gcggcagggg  ctgcagaagg  180
   agtcgncgta  tggagtctng  aaccngagga  tttgtcngcc  gtcacgatgg  agcggtttga  240
   acctcagatt  aatgctgagg  aaagtgaat  tcgttattct  acatggaaga  aagctgtgat  300
65  gaagtcaatg  ggttgggtta  caactcaatc  tccagaangt  ggtgacccta  gtntcttctg  360
   tagtctgccc  ttgnntttt  ttatagttag  tagcatggna  atgttaatcg  gagcaaggta  420
   catctcaggt  attccat  437

```

Reivindicaciones:

1. Un método para predecir la idoneidad de un tratamiento con una terapia de destino para un trastorno relacionado gastrointestinal en un sujeto, en el que el sujeto es un paciente que proporciona la muestra antes de la administración de la terapia, y en el que la terapia es un anticuerpo anti-TNF α , que comprende:
 - a) preparación de una muestra de ácidos nucleicos a partir de una muestra obtenida del sujeto;
 - b) poner en contacto la muestra con un panel de segmentos de ácido nucleico que consiste en SEQ ID NOS: 1-20 para detectar niveles de los segmentos de panel;
 - c) la evaluación de la muestra frente a un patrón de referencia de una respuesta a la terapia para determinar los niveles relativos de expresión de todos los miembros del grupo que consta de las secuencias de nucleótidos correspondientes a SEQ ID NOS: 1-20 en comparación con el estándar de referencia; y
 - d) correlacionar los niveles de expresión relativa de la muestra y el estándar de referencia con la idoneidad del tratamiento con la terapia de destino para el trastorno gastrointestinal relacionado.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-TNF α es infliximab.
3. El método de la reivindicación 2, en el que el trastorno relacionado gastrointestinal es colitis ulcerosa.
4. El método de la reivindicación 3, en el que el patrón de referencia es de una biopsia de una respuesta a la terapia de destino.
5. El método de la reivindicación 1, en el que el panel es un conjunto de segmentos de ácido nucleico.
6. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra comprende una muestra de biopsia de colon o células de sangre periférica.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que es un método de prueba a base de matriz para predecir la idoneidad de un tratamiento con una terapia de destino para un trastorno gastrointestinal relacionado en un paciente, que comprende:
 - a) preparar una mezcla de ácidos nucleicos de una muestra obtenida del paciente;
 - b) marcar dicha muestra de ácidos nucleicos con un marcador detectable para formar una muestra;
 - c) poner en contacto la muestra con una matriz que comprende una pluralidad de segmentos de ácido nucleico, en el que cada segmento de ácido nucleico se inmoviliza a una dirección discreta y conocidas en una superficie del sustrato de la matriz, en el que un panel de genes gastrointestinal relacionados que consiste en las secuencias de nucleótidos correspondientes a SEQ ID NOS: 1-20 se identifican como características de la matriz por la dirección, y en el que dicha matriz comprende además al menos un ácido nucleico de calibración en una dirección conocida sobre el sustrato;
 - d) determinar el grado de unión de los ácidos nucleicos de muestras a los segmentos de ácido nucleico; y
 - e) comparar el grado de unión a la norma de referencia para permitir una evaluación de la idoneidad del tratamiento.
8. El método de la reivindicación 7, en el que la etapa de comparación comprende la evaluación de la muestra frente a un patrón de referencia para determinar la magnitud del cambio en las cantidades de las secuencias de nucleótidos correspondientes a SEQ ID NOS: 1-20.
9. El método de la reivindicación 8, en el que:
 - i) el trastorno relacionado gastrointestinal es colitis ulcerosa y el panel de genes gastrointestinal relacionados es un panel de genes relacionados con colitis ulcerosa;
 - ii) la terapia diana es un anticuerpo anti-TNF α ;
 - iii) la muestra es de una biopsia de colon de un paciente seleccionado de entre el grupo que consiste en pacientes con sospecha de colitis ulcerosa y pacientes con diagnóstico de colitis ulcerosa no sometidos a tratamiento;
 - iv) la muestra es de una fuente seleccionada del grupo que consiste de un paciente proporcionando la muestra antes de la administración de una terapia, un paciente que tiene una enfermedad similar o condición tratados con un placebo, y una muestra de un banco biológico;
 - v) la muestra comprende una muestra de biopsia de colon o células de sangre periférica; o
 - vi) la comparación del grado de etapa de unión comprende además una matriz rigurosa de la similitud de los cambios de intensidad característica de la matriz del panel de genes relacionados con colitis ulcerosa.
10. Un reactivo para la matriz de la idoneidad de un anticuerpo anti-TNF α para un trastorno gastrointestinal relacionado en un célula o sujeto antes de la administración del anticuerpo anti-TNF α , que comprende oligonucleótidos que comprenden al menos 15 nucleótidos que comprende o complementa una secuencia de nucleótidos de cada una de las secuencias de nucleótidos correspondientes a SEQ ID NOS: 1-20.

11. El reactivo de la reivindicación 10, en el que el trastorno gastrointestinal relacionado es colitis ulcerosa y, opcionalmente, en el que el anticuerpo anti-TNF α es infliximab.

5 12. Un método de matriz de la idoneidad de un anticuerpo anti-TNF α para un trastorno gastrointestinal relacionado en una muestra de paciente de un paciente antes de la administración del anticuerpo anti-TNF α , comprende la puesta en contacto de la muestra del paciente con el reactivo de la reivindicación 10 y la comparación de los niveles de al menos una parte de cada uno de los genes de las secuencias de nucleótidos correspondientes a SEQ ID NOS: 1-20 a un patrón de referencia, en el que el patrón de referencia es de un respondedor al anticuerpo anti-TNF α .

10 13. El método de la reivindicación 12:

i) en el que la prueba se realiza por RT-PCR o

ii) en el que el anticuerpo anti-TNF α es infliximab.

15

14. Un método de poner a prueba la eficacia de un anticuerpo anti-TNF α para colitis ulcerosa, que comprende:

a) poner en contacto una muestra de un paciente que está siendo tratado para la colitis ulcerosa con el reactivo de la reivindicación 10;

20 b) medir los niveles de los 20 miembros; y

c) correlacionar los niveles de los 20 miembros con la eficacia del anticuerpo anti-TNF α mediante la comparación de los niveles a los niveles en un estándar de referencia, en el que el patrón de referencia es de un respondedor al anticuerpo anti-TNF α .

25 15. El método de la reivindicación 14, en el que el anticuerpo anti-TNF α es infliximab.

30

35

40

45

50

55

60

65