

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 055**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.09.2010 PCT/US2010/047721**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2011 WO11028933**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2010 E 10814513 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2473636**

54 Título: **Diagnóstico de interferón de tipo 1**

30 Prioridad:

03.09.2009 US 239630 P

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

22.05.2017

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE, LLC (100.0%)
One MedImmune Way
Gaithersburg, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**HIGGS, BRANDON;
ZHU, WEI;
MOREHOUSE, CHRIS;
WHITE, BARBARA;
JALLAL, BAHIIJA y
YAO, YIHONG**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 613 055 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

Diagnóstico de interferón de tipo 1

5 Listado de secuencias

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha presentado en formato ASCII a través de EFS-Web. La copia en ASCII, creada el 1 de septiembre de 2010, se denomina MED217T4.txt y tiene un tamaño de 28.665 bytes.

10

Campo de la divulgación

La presente divulgación se refiere a marcadores farmacodinámicos (PD) inducibles por interferones de tipo 1, tales como el interferón (IFN) alfa, a sondas y kits que detectan los marcadores PD, y a métodos que los emplean. La presente divulgación se refiere además a marcadores PD inducidos por enfermedades autoinmunitarias. La presente divulgación se refiere además a genes cuya expresión puede usarse como diagnóstico para pacientes que padecen enfermedades autoinmunitarias, tales como LES, DM, PM, SSc, AR, Sjogren y nefritis lúpica. La divulgación se refiere además a genes cuya expresión puede usarse para identificar a pacientes que padecen una enfermedad autoinmunitaria que responderán a un agente terapéutico que modula la actividad del interferón de tipo 1, tal como un anticuerpo anti-interferón alfa.

20

Antecedentes de la divulgación

La presente divulgación incluye marcadores PD que se inducen por IFN α . Los marcadores PD se pueden usar en métodos para tratar a pacientes con un agente terapéutico que modula la actividad del interferón de tipo 1, tal como un agente que se une a y modula la actividad del IFN α , métodos que identifican a pacientes como candidatos para un agente terapéutico que modula la actividad del interferón de tipo 1, métodos de diagnóstico de un trastorno asociado con un aumento de los niveles de interferón de tipo 1 o IFN α en un paciente, métodos para supervisar la progresión de la enfermedad de un paciente que recibe tratamiento con un agente terapéutico que modula la actividad del interferón de tipo 1, tal como un agente terapéutico que se une a y modula la actividad del IFN α , y métodos para identificar un agente terapéutico candidato para tratar trastornos mediados por IFN α . La presente divulgación también incluye marcadores PD implicados de otra manera en enfermedades autoinmunitarias tales como LES, DM, PM, SSc, AR, Sjogren y nefritis lúpica.

25

30

El documento WO2008070137 desvela el uso de una combinación de 25 genes, que incluye IF127, IF144, IF144L y RSAD2, para identificar un sujeto adecuado para el tratamiento de lupus con un anticuerpo anti-interferón alfa o un anticuerpo anti-receptor del interferón alfa que modula la actividad del interferón de tipo 1.

35

Sumario de la divulgación

40

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Una realización de la divulgación incluye un método para identificar un paciente como un candidato para un agente terapéutico que modula la actividad del interferón de tipo 1, tal como un agente terapéutico que se une a y modula la actividad de IFN α y un agente que se une a un receptor de un interferón de tipo I o IFN α . La presencia o ausencia de un perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α se detecta en una muestra del paciente. El perfil de expresión de marcadores PD comprende la regulación positiva de la expresión o actividad de un conjunto de genes. En una realización específica, el conjunto de genes puede ser: (a) IF127, IF144, IF144L, IF16 y RSAD2; o (b) IF144, IF144L, IF16 y RSAD2; o (c) IF127, IF144L, IF16 y RSAD2; o (d) IF127, IF144, IF16 y RSAD2; o (e) IF127, IF144, IF144L y RSAD2; o (f) IF127, IF144, IF144L e IF16.

45

Otra realización de la divulgación incluye un método para tratar a un paciente que tiene una enfermedad o trastorno mediado por IFN de tipo I o IFN α . Al paciente se le administra un agente que modula la actividad de IFN de tipo I o IFN α . En una realización, el agente se une a y neutraliza la actividad del IFN o IFN α . En otra realización, el agente se une a un receptor de un interferón de tipo 1 o IFN α . El agente neutraliza un perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α del paciente. El perfil de expresión de marcadores PD comprende la regulación positiva de la expresión o actividad de un conjunto de genes. En una realización específica, el conjunto de genes puede ser: (a) IF127, IF144, IF144L, IF16 y RSAD2; o (b) IF144, IF144L, IF16 y RSAD2; o (c) IF127, IF144L, IF16 y RSAD2; o (d) IF127, IF144, IF16 y RSAD2; o (e) IF127, IF144, IF144L y RSAD2; o (f) IF127, IF144, IF144L e IF16.

55

Otra realización más de la divulgación incluye un método para tratar a un paciente con una enfermedad autoinmunitaria que comprende un perfil de marcadores PD de IFN de tipo I o IFN α moderado o fuerte. Al paciente se le administra un agente que modula la actividad de IFN de tipo I o IFN α . En una realización, el agente se une a y neutraliza la actividad de IFN o IFN α . En otra realización, el agente se une a un receptor de un interferón de tipo 1 o IFN α . El agente neutraliza un perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α del paciente. El perfil de expresión de marcadores PD comprende la regulación positiva de la expresión o actividad de un conjunto de genes. En una realización específica, el conjunto de genes puede ser: (a) IF127, IF144, IF144L, IF16 y RSAD2; o (b) IF144, IF144L, IF16 y RSAD2; o (c) IF127, IF144L, IF16 y RSAD2; o (d) IF127, IF144, IF16 y RSAD2; o (e) IF127, IF144,

65

IFI44L y RSAD2; o (f) IFI27, IFI44, IFI44L e IFI6.

5 Una realización adicional de la divulgación incluye un método para neutralizar un perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α en un paciente que lo necesita. Al paciente se le administra un agente que modula la actividad de IFN de tipo I o IFN α . En una realización, el agente se une a y neutraliza la actividad de IFN o IFN α . En otra realización, el agente se une a un receptor de un interferón de tipo 1 o IFN α . El agente neutraliza un perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN o IFN α de tipo I del paciente. El perfil de expresión de marcadores PD comprende la regulación positiva de la expresión o actividad de un conjunto de genes. En una realización específica, el conjunto de genes puede ser: (a) IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (b) IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (c) IFI27, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (d) IFI27, IFI44, IFI6 y RSAD2; o (e) IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2; o (f) IFI27, IFI44, IFI44L e IFI6.

15 Otra realización de la divulgación incluye un método para diagnosticar un trastorno asociado con niveles aumentados de IFN α en un paciente. En una muestra del paciente se detecta la presencia o ausencia de un perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α . El perfil de expresión de marcadores PD comprende la regulación positiva de la expresión o actividad de un conjunto de genes. En una realización específica, el conjunto de genes puede ser: (a) IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (b) IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (c) IFI27, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (d) IFI27, IFI44, IFI6 y RSAD2; o (e) IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2; o (f) IFI27, IFI44, IFI44L e IFI6.

20 Una realización adicional de la divulgación incluye un método para supervisar la progresión de la enfermedad de un paciente que recibe tratamiento con un agente terapéutico que se une a y modula la actividad del IFN α . En una primera muestra del paciente se obtiene un primer perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α . Al paciente se le administra un agente que modula la actividad de IFN de tipo I o IFN α . En una realización, el agente se une a y neutraliza la actividad de IFN o IFN α . En otra realización, el agente se une a un receptor de un interferón de tipo 1 o IFN α . A partir de una segunda muestra del paciente se obtiene un segundo perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α . El primer y el segundo perfiles de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α se comparan. El perfil de expresión de marcadores PD comprende la regulación positiva de la expresión o actividad de un conjunto de genes. En una realización específica, el conjunto de genes puede ser: (a) IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (b) IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (c) IFI27, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (d) IFI27, IFI44, IFI6 y RSAD2; o (e) IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2; o (f) IFI27, IFI44, IFI44L e IFI6.

35 Otra realización de la divulgación incluye un método para identificar un agente terapéutico candidato para tratar trastornos mediados por IFN α . Se ponen en contacto células que comprenden un perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α con un agente. Se detecta la presencia o ausencia de un cambio en el perfil de expresión de marcadores PD inducido por IFN α de las células. El perfil de expresión de marcadores PD comprende la regulación positiva de la expresión o actividad de un conjunto de genes. En una realización específica, el conjunto de genes puede ser: (a) IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (b) IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (c) IFI27, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (d) IFI27, IFI44, IFI6 y RSAD2; o (e) IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2; o (f) IFI27, IFI44, IFI44L e IFI6.

40 Una realización adicional de la divulgación incluye un conjunto de oligonucleótidos. El conjunto de oligonucleótidos puede comprender oligonucleótidos que detectan específicamente la expresión de un conjunto de genes. En una realización específica, el conjunto de genes puede ser: (a) IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (b) IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (c) IFI27, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (d) IFI27, IFI44, IFI6 y RSAD2; o (e) IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2; o (f) IFI27, IFI44, IFI44L e IFI6.

45 Otra realización adicional más de la divulgación incluye oligonucleótidos que detectan específicamente 18S, ACTB y GAPDH.

50 Otra realización de la divulgación es un kit que comprende oligonucleótidos para detectar específicamente al menos cuatro de IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2, y 18S, ACTB y GAPDH, así como reactivos adecuados para la detección.

55 Otra realización de la divulgación incluye un método para detectar la actividad de IFN en una muestra. Se incuban con una muestra células que comprenden una secuencia polinucleotídica que comprende un gen indicador bajo el control de un elemento de respuesta estimulado por IFN. Se detecta la expresión del gen indicador.

60 Otra una realización adicional de la divulgación incluye un método para supervisar la progresión o regresión de un trastorno autoinmunitario en un paciente. A partir de una primera muestra del paciente se obtiene un primer perfil de expresión de marcadores PD. A partir de una segunda muestra del paciente se obtiene un segundo perfil de expresión de marcadores PD. El primer y el segundo perfiles de expresión de marcadores PD se comparan. Una variación en el primer y el segundo perfiles de expresión de marcadores PD indica progresión o regresión de la enfermedad.

Breve descripción de las figuras

- 5 Figura 1. Curva característica operativa del receptor (ROC) para la firma de cuatro genes (IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2) usada para un diagnóstico. Este gráfico demuestra la relación entre sensibilidad (tasa de verdaderos positivos) y 1-especificidad (tasa de falsos positivos) para los pacientes con LES tratados usando el criterio de valoración clínico primario en los días 182 y 196.
- 10 Figuras 2A y B. Límite claro entre pacientes positivos y negativos en el ensayo de diagnóstico de LES usando el ensayo basado en la firma de cuatro genes (IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2). (A) Se muestra el promedio de \log_2 del cambio en veces - usando la plataforma de matriz de baja densidad TaqMan (TLDA) de qRT-PCR de Applied Biosystem para pacientes negativos para el ensayo y positivos para el ensayo. (B) Promedio de \log_2 del cambio en veces en el gráfico de densidad de los valores de firma de genes para pacientes con LES tratados con el fármaco.
- 15 Figuras 3A y B. Área bajo la curva ajustada con respecto al tiempo menos la puntuación de referencia SLEDAI en pacientes con LES positivos (A) o negativos (B) para la firma de cuatro genes (IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2) en cohortes tratadas con placebo o con 0,3/1/3/10 mg/kg de MEDI-545. Todos los datos proceden de un estudio de aumento de la dosis, controlado con placebo, doble ciego, aleatorizado, multicéntrico de fase 1b para evaluar múltiples dosis intravenosas de MEDI-545 en pacientes con LES de moderada a gravemente activo. Todos los sujetos con LES tienen una puntuación SLEDAI ≥ 6 antes de la selección.
- 20 Figuras 4A y B. Respuestas SELDAI, reducción (mejoría) ≥ 4 puntos. A. Positivo para el diagnóstico. B. Negativo para el diagnóstico. Todos los datos proceden de un estudio de aumento de la dosis, controlado con placebo, doble ciego, aleatorizado, multicéntrico, de fase 1b para evaluar múltiples dosis intravenosas de MEDI-545 en pacientes con LES de moderada a gravemente activo. Todos los sujetos con LES tienen una puntuación SLEDAI ≥ 6 antes de la selección.
- 25 Figuras 5A y B. Respuestas SLEDAI, reducción (mejoría) > 4 puntos, en sujetos Dx+ con una reducción $> 50\%$ frente a una reducción $< 50\%$ en Dx después del punto de referencia. Todos los datos proceden de un estudio de aumento de la dosis, controlado con placebo, doble ciego, aleatorizado, multicéntrico, de fase 1b para evaluar múltiples dosis intravenosas de MEDI-545 en pacientes con LES de moderada a gravemente activo. Todos los sujetos con LES tienen una puntuación SLEDAI ≥ 6 antes de la selección.
- 30 Figuras 6A y B. Respuestas compuestas. A) Respuesta compuesta para pacientes positivos para la firma de cuatro genes. B) Respuesta compuesta para pacientes negativos para la firma de cuatro genes. Todos los datos proceden de un estudio de aumento de la dosis, controlado con placebo, doble ciego, aleatorizado, multicéntrico, de fase 1b para evaluar múltiples dosis intravenosas de MEDI-545 en pacientes con LES de moderada a gravemente activo. Todos los sujetos con LES tienen una puntuación SLEDAI ≥ 6 antes de la selección.
- 35 Figuras 7A y B. Área bajo la curva de SLEDAI menos el punto de referencia. A) sujetos positivos para la firma de cuatro genes. B) sujetos negativos para la firma de cuatro genes. Todos los datos proceden de un estudio de aumento de la dosis, controlado con placebo, doble ciego, aleatorizado, multicéntrico, de fase 1b para evaluar múltiples dosis intravenosas de MEDI-545 en pacientes con LES de moderada a gravemente activo. Todos los sujetos con LES tienen una puntuación SLEDAI ≥ 6 antes de la selección.
- 40 Figuras 8A y B. Cambio de SLEDAI desde el punto de referencia. A) sujetos positivos para la firma de cuatro genes. B) sujetos negativos para la firma de cuatro genes. Todos los datos proceden de un estudio de aumento de la dosis, controlado con placebo, doble ciego, aleatorizado, multicéntrico, de fase 1b para evaluar múltiples dosis intravenosas de MEDI-545 en pacientes con LES de moderada a gravemente activo. Todos los sujetos con LES tienen una puntuación SLEDAI ≥ 6 antes de la selección.
- 45 Figuras 9 A-C. Los sujetos con una inhibición $> 50\%$ de firma de IFN de tipo I tienen mayores respuestas SLEDAI (reducción > 4 puntos). A) 1 mg/kg IV cada 2 semanas B) 3 mg/kg IV cada 2 semanas C) 10 mg/kg IV cada 2 semanas.
- 50 Figuras 10 A-C. Los sujetos con una inhibición $< 50\%$ de la firma de IFN de tipo I tienen menores respuestas SLEDAI (reducción > 4 puntos). A) 1 mg/kg IV cada 2 semanas B) 3 mg/kg IV cada 2 semanas C) 10 mg/kg IV cada 2 semanas.
- 55 Figuras 11A y B. Firma de cinco genes en diversas enfermedades. A) Firma de genes en sangre entera de pacientes normales, con LES, SM, PM, AR y SSc. B) Firma de genes en piel normal, piel con LES, piel con SSc, músculo normal, músculo con DM, músculo con PM y tejido sinovial normal.
- 60 Figuras 12A y B. Firma de cuatro genes en diversas enfermedades. A) Firma de genes en sangre entera de pacientes normales, LES, SM, PM, AR y SSc. B) Firma de genes en piel normal, piel con LES, piel con SSc, músculo normal, músculo con DM, músculo con PM y tejido sinovial normal.
- 65

Descripción detallada

La divulgación incluye métodos para identificar, diagnosticar, tratar y supervisar la progresión de enfermedades en pacientes. Los pacientes incluyen cualquier animal que tenga una enfermedad, trastorno o afección inducible por IFN de tipo I o IFN α . Los pacientes incluyen cualquier animal que tenga una enfermedad, trastorno o afección autoinmunitaria. Las enfermedades/trastornos/afecciones autoinmunitarias incluyen lupus eritematoso sistémico (LES), diabetes mellitus insulino dependiente, enfermedad inflamatoria del intestino (incluyendo enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enfermedad celíaca), esclerosis múltiple, psoriasis, tiroiditis autoinmunitaria, esclerodermia, artritis reumatoide, glomerulonefritis, miositis inflamatoria idiopática, síndrome de Sjogren, vasculitis, miositis por cuerpos de inclusión (MCI), dermatomiositis (DM), polimiositis (PM), sarcoidosis, esclerodermia y nefritis lúpica. El paciente puede tener la enfermedad, trastorno o afección como resultado de una investigación experimental, por ejemplo, puede ser un modelo experimental desarrollado para la enfermedad, trastorno o afección. Como alternativa, el paciente puede tener la enfermedad, trastorno o afección en ausencia de manipulación experimental. Los pacientes incluyen seres humanos, ratones, ratas, caballos, cerdos, gatos, perros y cualquier animal usado para investigación.

El paciente puede comprender un perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α . El perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α puede ser un perfil fuerte, un perfil moderado o un perfil débil. Puede decirse fácilmente que el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α es fuerte, moderado o débil determinando la desregulación en veces del perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α del paciente (por ejemplo, el aumento en veces en la expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α regulados positivamente en el paciente), con respecto a una o más muestras de control o uno o más pacientes de control y comparando la desregulación en veces del paciente con la de otros pacientes que tienen un perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α . La desregulación en veces puede calcularse por métodos bien conocidos en la técnica de la misma manera que la comparación. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 8 de la Solicitud Internacional n.º PCT/US2007/024947. En una realización, la desregulación en veces se calcula como el cambio en veces en los niveles de expresión de ARNm. De forma similar, pueden generarse perfiles fuertes, moderados o débiles para genes que no son específicamente inducibles por IFN de tipo I o IFN α .

La regulación positiva o negativa de un grupo de genes comprendidos por un perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α puede calcularse por métodos bien conocidos en la técnica. En una realización, la regulación positiva o negativa se calcula como el promedio de cambio en veces en los niveles de expresión de ARNm del grupo de al menos cuatro genes elegidos entre IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2. En otra realización, la regulación positiva o negativa se calcula como la diferencia entre el Ct (ciclo umbral) medio para al menos cuatro genes diana (IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2) y el Ct medio de tres genes de control.

I. Perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α

A. Genes de diagnóstico

El grupo de genes incluidos en el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α del paciente son (a) IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (b) IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (c) IFI27, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (d) IFI27, IFI44, IFI6 y RSAD2; o (e) IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2; o (f) IFI27, IFI44, IFI44L e IFI6.

En una realización específica, el grupo de genes incluidos en el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α del paciente comprende IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2. En otra realización específica, el grupo de genes incluidos en el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α del paciente consiste en IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2. En una realización específica adicional, el grupo de genes incluidos en el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α del paciente comprende IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2. En otra realización específica, el grupo de genes incluidos en el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α del paciente consiste en IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2.

Los marcadores PD inducibles por IFN α en un perfil de expresión pueden incluir (a) IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (b) IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (c) IFI27, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (d) IFI27, IFI44, IFI6 y RSAD2; o (e) IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2; o (f) IFI27, IFI44, IFI44L e IFI6.

Los marcadores PD inducibles por IFN α en un perfil de expresión pueden consistir en (a) IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (b) IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (c) IFI27, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o (d) IFI27, IFI44, IFI6 y RSAD2; o (e) IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2; o (f) IFI27, IFI44, IFI44L e IFI6.

B. Proteínas séricas

Los marcadores PD inducibles por IFN α en un perfil de expresión pueden incluir alteraciones en uno cualquiera o más de los niveles de las proteínas séricas adiponectina, alfa-fetoproteína, apolipoproteína CIII, beta-2 microglobulina, antígeno 125 de cáncer, antígeno 19-9 de cáncer, eotaxina, FABP, factor VII, ferritina, IL-10, IL-

12p70, IL-16, IL-18, IL-1ra, IL-3, MCP-1, MMP-3, mioglobina, SGOT, factor tisular, TIMP-1, TNF RII, TNF-alfa, VCAM-1, vWF, BDNK, complemento 3, ligando de CD40, EGF, ENA-78, EN-RAGE, IGF-1, MDC, mieloperoxidasa, RANTES o trombopoyetina.

5 Los marcadores PD inducibles por IFN α en un perfil de expresión pueden incluir alteraciones en uno cualquiera o más de los niveles de las proteínas séricas adiponectina, alfa-fetoproteína, apolipoproteína CIII, beta-2 microglobulina, antígeno 125 de cáncer, antígeno 19-9 de cáncer, eotaxina, FABP, factor VII, ferritina, IL-10, IL-12p70, IL-16, IL-18, IL-1ra, IL-3, MCP-1, MMP-3, mioglobina, SGOT, factor tisular, TIMP-1, TNF RII, TNF-alfa, VCAM-1, orvWF.

10 Los marcadores PD inducibles por IFN α en un perfil de expresión pueden incluir alteraciones en uno cualquiera o más de los niveles de proteínas séricas BDNK, complemento 3, ligando de CD40, EGF, ENA-78, EN-RAGE, IGF-1, MDC, mieloperoxidasa, RANTES o trombopoyetina.

15 Los perfiles de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α pueden incluir una expresión o actividad regulada positivamente de genes en células expuestas a niveles elevados de IFN α con respecto al punto de referencia. La expresión o actividad regulada positivamente de genes incluye un aumento en la expresión de ARNm de un gen, un aumento en la expresión de una proteína codificada por un gen o un aumento en la actividad de una proteína codificada por un gen. La expresión o actividad de los genes puede regularse positivamente como una respuesta directa o indirecta a IFN α .

20

C. Subtipos de interferón

25 El paciente que comprende el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α puede comprender además la regulación positiva de la expresión de cualquier número de subtipos de IFN α o IFN de tipo I. Los subtipos de IFN α o IFN de tipo I pueden incluir más de uno, más de dos, más de tres, más de cuatro, más de cinco, más de seis, más de siete, más de ocho, más de nueve o más de diez subtipos de IFN α o IFN de tipo I. Estos subtipos pueden incluir IFN α 1, IFN α 2, IFN α 4, IFN α 5, IFN α 6, IFN α 7, IFN α 8, IFN α 10, IFN α 14, IFN α 17, IFN α 21, IFN β o IFN ω . El paciente puede comprender la regulación positiva de la expresión de los subtipos de IFN IFN α 1, IFN α 2, IFN α 8 e IFN α 14.

30

35 Como alternativa, un paciente tratado en los métodos incluidos por la divulgación simplemente puede ser uno identificado como uno que comprende un perfil de expresión génica con regulación positiva de la expresión de cualquier número de subtipos de IFN α o IFN de tipo I. Los subtipos de IFN α o IFN de tipo I pueden incluir más de uno, más de dos, más de tres, más de cuatro, más de cinco, más de seis, más de siete, más de ocho, más de nueve o más de diez subtipos de IFN α o IFN de tipo I. Estos subtipos pueden incluir IFN α 1, IFN α 2, IFN α 4, IFN α 5, IFN α 6, IFN α 7, IFN α 8, IFN α 10, IFN α 14, IFN α 17, IFN α 21, IFN β o IFN ω . Estos subtipos pueden incluir IFN α 1, IFN α 2, IFN α 8 e IFN α 14.

40

D. Receptores de IFN α

45 El paciente que comprende el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α puede comprender además la regulación positiva de la expresión de los receptores de IFN α , IFNAR1 o IFNAR2, o ambos, o TNF α , o IFN γ , o receptores de IFN γ (IFNGR1, IFNGR2 o tanto IFNGR1 como IFNGR2). El paciente puede identificarse simplemente como un paciente que comprende la regulación positiva de la expresión de los receptores de IFN α , IFNAR1 o IFNAR2, o ambos, o TNF α , o IFN γ o receptores de IFN γ (IFNGR1, IFNGR2 o tanto IFNGR1 como IFNGR2).

50

II. Regulación positiva

55 La regulación positiva o regulación negativa de los marcadores DP inducibles por IFN de tipo I o IFN α en el perfil de expresión del paciente puede tener cualquier grado con respecto al de una muestra de un control (que puede proceder de una muestra que no es un tejido enfermo del paciente (por ejemplo, piel no lesionada de un paciente con psoriasis) o de una persona sana no afectada por la enfermedad o trastorno) o puede ser relativo al de genes del paciente cuya expresión no ha cambiado por la enfermedad (denominados genes "constitutivos").

60

65 El grado de regulación positiva o regulación negativa puede ser de al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 90 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 100 %, al menos un 125 % o al menos un 300 %, o al menos un 400 %, o al menos un 500 % o más con respecto al control o muestra de control.

70

El perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α puede calcularse como el promedio del aumento en veces en la expresión o actividad del conjunto de genes comprendidos por el marcador PD. El perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α también puede calcularse como la diferencia entre el Ct (ciclo umbral) medio para los cuatro genes diana y el Ct medio de tres genes de control.

75

- 5 El promedio de aumento en veces en la expresión o actividad del conjunto de genes puede estar comprendido entre al menos aproximadamente 2 y al menos aproximadamente 15, entre al menos aproximadamente 2 y al menos aproximadamente 10, o entre al menos aproximadamente 2 y al menos aproximadamente 5. El promedio de aumento en veces en la expresión o actividad del conjunto de genes puede ser de al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 2,5, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 3,5, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 4,5, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 5,5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 6,5, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9 o al menos aproximadamente 10.
- 10 El grado de aumento de expresión permite la identificación de un límite de cambio en veces para identificar pacientes positivos para la firma y negativos para la firma que padecen enfermedades autoinmunitarias. En una realización, el límite es al menos aproximadamente 2. En otra realización, el límite es al menos aproximadamente 2,5. En otra realización, el límite es al menos aproximadamente 3. En otra realización, el límite es al menos aproximadamente 3,5. En otra realización, el límite es al menos aproximadamente 4. En otra realización, el límite es al menos aproximadamente 4,5. En otra realización, el límite se elige entre al menos 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4 y 4,5. En otra realización, el límite está comprendido entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8. En una realización, el límite es la media de los niveles de expresión aumentados de al menos cuatro de IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2. En otra realización, el límite es la media de los niveles de expresión aumentados de al menos cuatro de IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2.
- 15 El grado de aumento de expresión también permite la identificación de un límite de Ct delta para identificar pacientes positivos para la firma y negativos para la firma que padecen enfermedades autoinmunitarias. En una realización, el límite es al menos aproximadamente 7,6. En otra realización, el límite es 7,56. El límite de cambio en veces puede usarse para determinar un límite de Ct delta apropiado (por ejemplo, $1 < \log_2$ del cambio en veces < 3 corresponde a un intervalo de Ct delta de 8,65 a 6,56). De esta manera, en otra realización, el límite de Ct delta está comprendido entre aproximadamente 6,56 y aproximadamente 8,56.
- 20 Además, el paciente puede sobreexpresar o tener un tejido que sobreexpresa un subtipo de IFN de tipo I de al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 100 %, al menos un 125 %, al menos un 150 %, o al menos un 200 %, o al menos un 300 %, o al menos un 400 % o al menos un 500 % con respecto al del control. El subtipo de IFN de tipo I puede ser uno cualquiera de IFN α 1, IFN α 2, IFN α 4, IFN α 5, IFN α 6, IFN α 7, IFN α 8, IFN α 10, IFN α 14, IFN α 17, IFN α 21, IFN β o IFN ω . Los subtipos de IFN de tipo I pueden incluir todos de IFN α 1, IFN α 2, IFN α 8 e IFN α 14.
- 25 La expresión o actividad regulada positivamente de cualquier gen detectado en una muestra, mediante sondas, o mediante sondas en kits en un perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α puede ser al menos 1,2 veces, al menos 1,25 veces, al menos 1,3 veces, al menos 1,4 veces, al menos 1,5 veces, al menos 2,0 veces, al menos 2,25 veces, al menos 2,5 veces, al menos 2,75 veces, al menos 3,0 veces, al menos 3,5 veces, al menos 4,0 veces, al menos 4,5 veces, al menos 5,0 veces, al menos 6,0 veces, al menos 7,0 veces, al menos 8,0 veces, al menos 9,0 veces, al menos 10 veces, al menos 15,0 veces, al menos 20,0 veces, al menos 25,0 veces o al menos 50,0 veces mayor que los niveles del punto de referencia de las células de control, por ejemplo, células de voluntarios sanos o células de animales de control o células no expuestas a IFN α en cultivo. Todos los genes en el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α pueden tener una expresión o actividad regulada positivamente con el mismo aumento en veces. Como alternativa, los genes en el perfil de expresión de marcadores PD pueden tener niveles variables de expresión o actividad regulada positivamente.
- 30 A. Medición de la regulación positiva
- 35 La regulación positiva o negativa de la expresión o actividad génica de marcadores PD inducibles por IFN α puede determinarse por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, la regulación positiva o negativa de la expresión génica puede detectarse determinando los niveles de ARNm. La expresión de ARNm puede determinarse por transferencia de Northern, transferencia por ranuras, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa tras transcripción inversa, o técnicas de hibridación de chips de genes. Véanse en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.744.305 y 5.143.854 ejemplos de fabricación de matrices de ácidos nucleicos para técnicas de hibridación de chips de genes. Véanse en Establishing and functional characterization of an HEK-293 cell line expressing autofluorescently tagged (β -actin (pEYFP-ACTIN) and the neurokinin type 1 receptor (NK1-R) Hrovat, A; Zavec, AB; Pogacnik, A; Frangez, R; Vrecl, M 2010 Cellular & Molecular Biology Letters 1, 55-69, Expression profiles of proliferative and antiapoptotic genes in sporadic and colitis-related mouse colon cancer models, Svec, J; Ergang, P; Mandys, V; Kment, M; Pacha, J 2010 International Journal of Experimental Pathology 1, 44-53, and Protein kinase inhibitors emodin and dichloro-ribofuranosylbenzimidazole modulate the cellular accumulation and cytotoxicity of cisplatin in a schedule-dependent manner, Kurokawa, T; He, GA; Siddik, ZH 2010 Cancer Chemotherapy and Pharmacology 3, 427-436, ejemplos de cómo usar el método TAQMAN® para medir la expresión génica.
- 40 Pueden elegirse cebadores que se unan selectivamente a dianas en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) basándose en cebadores de determinación empírica que hibridan en una reacción PCR y producen suficiente señal
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

para detectar la diana entre el efecto de fondo, o pueden predecirse usando la temperatura de fusión del dúplex cebador:diana como se describe en Maniatis *et al.* Molecular Cloning, Segunda Edición, Sección 11.46. 1989. De forma similar, pueden elegirse empíricamente o predecirse sondas para detectar productos de PCR en un método TAQMAN® o relacionado. Dichos cebadores y sondas (colectivamente "oligonucleótidos") pueden tener una longitud entre 10 y 30 nucleótidos o mayor.

La regulación positiva o negativa de la expresión o actividad génica de marcadores PD inducibles por IFN α puede determinarse detectando los niveles de proteína. Los métodos para detectar niveles de expresión de proteína incluyen ensayos basados en inmunología tales como ensayos de inmunoabsorbente ligado a enzimas, transferencia de Western, matrices de proteínas y tinción con plata.

Un perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α puede comprender un perfil de actividad de proteína. La regulación positiva o negativa de la expresión o actividad de genes de marcadores PD inducibles por IFN α puede determinarse detectando la actividad de proteínas que incluyen, pero sin limitación, actividad de fosforilación detectable, actividad de desfosforilación o actividad de escisión. Además, la regulación positiva o negativa de la expresión o actividad de genes de marcadores PD inducibles por IFN α puede determinarse detectando cualquier combinación de estos niveles o actividades de expresión génica.

III. Enfermedades, trastornos o afecciones inducibles por IFN de tipo I o IFN α

Una enfermedad, trastorno o afección inducible por IFN de tipo I o IFN α es cualquiera que presente un perfil de expresión o firma génica de marcadores PD de IFN de tipo I o IFN α . Un perfil de expresión de marcadores PD y una firma génica se considerarán equivalentes. Estas enfermedades, trastornos o afecciones incluyen las que tienen un componente autoinmunitario tal como lupus eritematoso sistémico (LES), diabetes mellitus insulino dependiente, enfermedad inflamatoria del intestino (incluyendo enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enfermedad celíaca), esclerosis múltiple, psoriasis, tiroiditis autoinmunitaria, esclerodermia, artritis reumatoide, glomerulonefritis, miositis inflamatoria idiopática, síndrome de Sjogren, vasculitis, miositis con cuerpos de inclusión (MCI), dermatomiositis, polimiositis, nefritis lúpica y sarcoidosis. Otras enfermedades, trastornos o afecciones incluyen la enfermedad de injerto contra hospedador y rechazo de trasplantes.

A. Síntomas de los pacientes

Los pacientes también pueden presentar cualquiera de varios síntomas como se analiza, por ejemplo, en la Solicitud Internacional n.º PCT/US2007/024941 o pueden tener una puntuación clínica SLEDAI o una puntuación BILAG como se analiza en dicha solicitud. Estos síntomas pueden incluir fatiga, lesiones de órganos, erupción malar y alopecia. Al paciente se le puede asignar una puntuación usando un sistema de puntuación clínico conocido, por ejemplo, SLEDAI que es un índice de actividad de la enfermedad LES medido y evaluado en los últimos 10 días (Bombardier C, Gladman D, Urowitz M B, Caron D, Chang C H and the Committee on Prognosis Studies in SLE: Derivation of the SLEDAI for Lupus Patients. *Arthritis Rheum* 35: 630-640, 1992). La actividad de la enfermedad bajo el sistema de puntuación SLEDAI puede variar de 0 a 105. Se han definido las siguientes categorías de actividad SLEDAI: sin actividad (SLEDAI = 0); actividad leve (SLEDAI = 1-5); actividad moderada (SLEDAI = 6-10); actividad alta (SLEDAI = 11-19); actividad muy alta (SLEDAI = 20 o superior). (Griffiths, *et al.*, Assessment of Patients with Systemic Lupus Erythematosus and the use of Lupus Disease Activity Indices). Otro índice de puntuación de enfermedad es el índice BILAG, que es un índice de actividad de LES que está basado en manifestaciones clínicas específicas en ocho sistemas de órganos: resultados generales, mucocutáneos, neurológicos, musculoesqueléticos, cardiovasculares, respiratorios, renales y hematológicos. La puntuación se basa en un sistema de letras, pero también pueden asignarse puntuaciones numéricas ponderadas a cada letra, haciendo que sea posible calcular una puntuación BILAG en el intervalo de 0-72. (Griffiths, *et al.*, Assessment of Patients with Systemic Lupus Erythematosus and the use of Lupus Disease Activity Indices). Otros índices de puntuación incluyen la puntuación PGA, el índice compuesto de respondedores (CRI) y el ensayo ANAM4™. Los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, de tratamiento de un trastorno autoinmunitario, pueden usarse para cualquier sujeto identificado como un sujeto que tiene cualquier nivel de actividad de enfermedad medido por cualquier metodología de clasificación conocida en este campo, por ejemplo, leve, moderada, alta o muy alta. Los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, de tratamiento de un trastorno autoinmunitario, pueden dar como resultado una reducción en los síntomas del paciente o pueden dar como resultado una mejoría en una puntuación de la enfermedad para la enfermedad, trastorno o afección inducible por IFN α o IFN de tipo I del paciente.

IV. Agentes terapéuticos

Un agente terapéutico puede administrarse a un paciente o un paciente puede identificarse como un candidato para la administración de un agente o un agente terapéutico. Un agente terapéutico puede modular la actividad del interferón de tipo I o IFN α . Los agentes terapéuticos adecuados incluyen moléculas que se unen a y modulan la actividad de IFN de tipo I o IFN α . Los agentes terapéuticos adecuados incluyen moléculas que se unen a y modulan la actividad de receptores de interferones de tipo I o IFN α . El agente terapéutico puede ser una molécula pequeña o un agente biológico. Si el agente terapéutico es una molécula pequeña, puede sintetizarse o identificarse y aislarse a partir de una fuente natural.

Si el agente terapéutico es un agente biológico, puede ser un anticuerpo específico para cualquier subtipo de IFN de tipo I o IFN α . Por ejemplo, el anticuerpo puede ser específico para uno cualquiera de IFN α 1, IFN α 2, IFN α 4, IFN α 5, IFN α 6, IFN α 7, IFN α 8, IFN α 10, IFN α 14, IFN α 17, IFN α 21, IFN β o IFN ω . Como alternativa, el anticuerpo puede ser específico para dos cualesquiera, tres cualesquiera, cuatro cualesquiera, cinco cualesquiera, seis cualesquiera, siete cualesquiera, ocho cualesquiera, nueve cualesquiera, diez cualesquiera, once cualesquiera o doce cualesquiera de los subtipos de IFN de tipo I o IFN α . Si el anticuerpo es específico para más de un subtipo de IFN de tipo I, el anticuerpo puede ser específico para IFN α 1, IFN α 2, IFN α 4, IFN α 5, IFN α 8, IFN α 10 e IFN α 21; o puede ser específico para IFN α 1, IFN α 2, IFN α 4, IFN α 5, IFN α 8 e IFN α 10; o puede ser específico para IFN α 1, IFN α 2, IFN α 4, IFN α 5, IFN α 8 e IFN α 21; o puede ser específico para IFN α 1, IFN α 2, IFN α 4, IFN α 5, IFN α 10 e IFN α 21. Los anticuerpos específicos para IFN de tipo I o IFN α incluyen MEDI-545, cualquier agente biológico o anticuerpo distinto de MEDI-545, anticuerpos descritos en las solicitudes de patente de Estados Unidos 11/009.410 presentada el 10 de diciembre de 2004 y 11/157.494 presentada el 20 de junio de 2005, 9F3 y otros anticuerpos descritos en la Patente de Estados Unidos n.º 7.087.726 (Ejemplo 1 y Ejemplo 2, los desvelados en la Tabla 3 y Tabla 4, y/o los desvelados en la tabla titulada "Depósito de Material" en las líneas 25-54, columna 56), NK-2 y YOK5/19 (documento WO 84/03105), LO-22 (Patente de Estados Unidos 4.902.618), 144 BS (Patente de Estados Unidos 4.885.166) y EBI-1, EBI-2 y EBI-3 (documento EP 119476). Un agente terapéutico que modula la actividad de IFN α puede neutralizar la actividad de IFN α . Un experto en la materia conocerá bien la preparación y formulación de dichos agentes biológicos y métodos para su administración.

MEDI-545 es un anticuerpo monoclonal (Mab) IgG1k de 147.000 Dalton completamente humano, que se une a la mayoría de subtipos de interferón alfa (IFN α). MEDI-545 está constituido en un 100% por secuencias proteicas humanas, lo cual hace que sea un anticuerpo monoclonal completamente humano. Los anticuerpos monoclonales completamente humanos pueden tener ventajas con respecto a otras formas de anticuerpos monoclonales, tales como anticuerpos quiméricos y humanizados, ya que pueden tener un perfil de seguridad más favorable y pueden eliminarse con menos rapidez del cuerpo humano, haciendo posible de esta manera la reducción de la frecuencia de dosificación. MEDI-545 se obtuvo a partir de un anticuerpo IgG4k, 13H5, que se seleccionó basándose en ensayos funcionales ya que tenía las propiedades más deseables para ser un posible agente terapéutico. 13H5 posteriormente se convirtió en un isotipo de anticuerpo IgG1, producido en células CHO, y seleccionado para la caracterización adicional y desarrollo preclínico con un diseño inicial de MDX-1103, ahora denominado MEDI-545. Véase también la Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2007/0014724; Solicitud PCT PCT/US2008/058133 presentada el 25 de marzo de 2008 titulada "Anticuerpos con Perfiles de Desamidación Disminuidos", y la Solicitud PCT PCT/US2008/058132 presentada el 25 de marzo de 2008.

El agente terapéutico puede ser un anticuerpo contra un receptor de interferón, incluyendo los desvelados en las Patentes de Estados Unidos n.º 7.619.070 y 7.662.381 y la Solicitud Internacional n.º PCT/US2009/033358.

A. Anticuerpos

El anticuerpo puede ser un anticuerpo sintético, un anticuerpo monoclonal, anticuerpos policlonales, un anticuerpo producido de forma recombinante, un intracuerpo, un anticuerpo multiespecífico (incluyendo anticuerpos biespecíficos), un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un Fv monocatenario (scFv) (incluyendo scFv biespecíficos), una molécula BiTE, un anticuerpo monocatenario, un fragmento Fab, un fragmento F(ab'), un Fv con enlaces disulfuro (sdFv), o un fragmento de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. El anticuerpo puede ser de una molécula de inmunoglobulina o una parte inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina. Además, el anticuerpo puede ser de cualquier isotipo. Por ejemplo, puede ser cualquiera de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa que comprende regiones variables y constantes, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como un anticuerpo monocatenario, o un fragmento Fab o Fab'2. El anticuerpo también puede conjugarse o unirse a un agente terapéutico, tal como una citotoxina o un isótopo radiactivo.

En los métodos de tratamiento, al paciente se le puede administrar un segundo agente distinto de un agente que se une a y modula la actividad de IFN α , o un agente que se une a y modula la actividad de un receptor de un interferón de tipo I o IFN α . Los segundos agentes incluyen, pero sin limitación, antiinflamatorios no esteroideos tales como ibuprofeno, naproxeno, sulindac, diclofenaco, piroxicam, ketoprofeno, diflunisal, nabumetona, etodolac y oxapropina, indometacina; fármacos antimaláricos tales como hidroxicloroquina; hormonas corticosteroides tales como prednisona, hidrocortisona, metilprednisolona y dexametasona; metotrexato; agentes inmunosupresores tales como azatioprina y ciclofosfamida; y agentes biológicos que, por ejemplo, se dirigen a las células T tales como Alefacept y Efalizumab, o se dirigen a TNF α , tales como Enbrel, Remicade y Humira.

B. Identificación de agentes terapéuticos candidatos

Un agente terapéutico candidato para tratar trastornos mediados por IFN α puede identificarse por los métodos incluidos por la divulgación. Los agentes terapéuticos candidatos pueden ser cualquier tipo de molécula incluyendo una molécula pequeña o un agente biológico. Un agente terapéutico candidato identificado por los métodos incluidos por la divulgación puede identificarse inmediatamente como útil como agente terapéutico para una enfermedad, trastorno o afección. Como alternativa, un agente terapéutico candidato identificado por los métodos incluidos por la

divulgación puede necesitar ensayarse y/o modificarse adicionalmente antes de la selección para tratar a los pacientes. Como alternativa, un agente terapéutico candidato identificado por los métodos incluidos por la divulgación puede, después de ensayarse adicionalmente, desecharse como molécula para tratar a los pacientes.

- 5 En métodos que identifican agentes terapéuticos candidatos, se ponen en contacto con un agente células que comprenden un perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α . Las células pueden ser cualquier tipo de células, tales como líneas celulares inmortalizadas disponibles en el mercado que comprenden un perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α , líneas celulares inmortalizadas disponibles en el mercado que se han tratado con IFN α para inducir un perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α , células aisladas de un paciente que tiene un perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α o células aisladas de un paciente sano y tratado con IFN α para inducir un perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α .

15 La presencia o ausencia de un cambio en el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α de las células se detecta después de poner en contacto las células con el agente. La presencia de cambio puede ser cualquier cambio en el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α que incluye una reducción de al menos un 10 % en la expresión o actividad regulada positivamente de al menos 1 gen en el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α , al menos una reducción de un 20 % de dicho al menos 1 gen regulado positivamente, al menos una reducción del 30 % de dicho al menos 1 gen regulado positivamente, al menos una reducción del 40 % de dicho al menos 1 gen regulado positivamente, al menos una reducción del 50 % de dicho al menos 1 gen regulado positivamente, al menos una reducción del 60 % de dicho al menos 1 gen regulado positivamente, al menos una reducción del 70 % de dicho al menos 1 gen regulado positivamente, al menos una reducción del 75 % de dicho al menos 1 gen regulado positivamente, al menos una reducción del 80 % de dicho al menos 1 gen regulado positivamente, al menos una reducción del 85 % de dicho al menos 1 gen regulado positivamente, al menos una reducción del 90 % de dicho al menos 1 gen regulado positivamente, al menos una reducción del 95 % de dicho al menos 1 gen regulado positivamente, al menos una reducción del 96 % de dicho al menos 1 gen regulado positivamente, al menos una reducción del 97 % de dicho al menos 1 gen regulado positivamente, al menos una reducción del 98 % de dicho al menos 1 gen regulado positivamente, al menos una reducción del 99 % de dicho al menos 1 gen regulado positivamente o una reducción del 100 % de dicho al menos 1 gen regulado positivamente.

30 V. Neutralización del perfil inducible por IFN de tipo I o IFN α en pacientes

El tratamiento con el agente puede dar como resultado la neutralización del perfil inducible por IFN de tipo I o IFN α . El tratamiento con el agente puede dar como resultado una reducción en uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno mediado por IFN de tipo I o IFN α . El tratamiento con el agente puede dar como resultado menos brotes relacionados con la enfermedad o trastorno mediado por IFN de tipo I o IFN α . El tratamiento con el agente puede dar como resultado un mejor pronóstico para el paciente que tiene la enfermedad o trastorno mediado por IFN de tipo I o IFN α . El tratamiento con el agente puede dar como resultado una mayor calidad de vida para el paciente. El tratamiento con el agente puede aliviar la necesidad de coadministrar segundos agentes o puede reducir la dosificación de administración del segundo agente al paciente. El tratamiento con el agente puede reducir el número de hospitalizaciones del paciente que están relacionadas con el trastorno o enfermedad mediada por IFN de tipo I o IFN α .

45 El agente que se une a y modula la actividad de IFN de tipo I o IFN α puede neutralizar un perfil inducible por IFN de tipo I o IFN α . La neutralización del perfil inducible por IFN de tipo I o IFN α puede ser una reducción en al menos uno, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro genes. La neutralización del perfil inducible por IFN de tipo I o IFN α es una reducción de al menos un 2 %, al menos un 3 %, al menos un 4 %, al menos un 5 %, al menos un 7 %, al menos un 8 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 % o al menos un 90 % de cualquiera de dichos al menos uno, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro genes regulados positivamente en el perfil inducible por IFN de tipo I o IFN α . Como alternativa, la neutralización del perfil inducible por IFN de tipo I o IFN α se refiere a una reducción de la expresión de genes inducibles por IFN de tipo I o IFN α regulados positivamente que está dentro de, como máximo un 50 %, como máximo un 45 %, como máximo un 40 %, como máximo un 35 %, como máximo un 30 %, como máximo un 25 %, como máximo un 20 %, como máximo un 15 %, como máximo un 10 %, como máximo un 5 %, como máximo un 4 %, como máximo un 3 %, como máximo un 2 % o como máximo un 1 % de los niveles de expresión de esos genes inducibles por IFN de tipo I o IFN α en una muestra de control. Si el agente que se une a y modula la actividad del IFN de tipo I o IFN α es un agente biológico, tal como un anticuerpo, el agente puede neutralizar el perfil de IFN de tipo I o IFN α a dosis de 0,3 a 30 mg/kg, de 0,3 a 10 mg/kg, de 0,3 a 3 mg/kg, de 0,3 a 1 mg/kg, de 1 a 30 mg/kg, de 3 a 30 mg/kg, de 5 a 30 mg/kg, de 10 a 30 mg/kg, de 1 a 10 mg/kg, de 3 a 10 mg/kg o de 1 a 5 mg/kg.

65 El agente que se une a y modula la actividad de IFN de tipo I o IFN α puede neutralizar adicionalmente o como alternativa la expresión de uno o más subtipos de IFN de tipo I o IFN α . Los subtipos de IFN de tipo I o IFN α pueden incluir cualquiera de los siguientes: más de uno, más de dos, más de tres, más de cuatro, más de cinco, más de seis, más de siete, más de ocho, más de nueve o más de diez subtipos de IFN de tipo I o IFN α . Estos subtipos pueden incluir IFN α 1, IFN α 2, IFN α 4, IFN α 5, IFN α 6, IFN α 7, IFN α 8, IFN α 10, IFN α 14, IFN α 17, IFN α 21, IFN β o IFN ω .

Estos subtipos pueden incluir todos de IFN α 1, IFN α 2, IFN α 8 e IFN α 14. Como alternativa, estos subtipos pueden incluir IFN α 1, IFN α 2, IFN α 4, IFN α 5, IFN α 8, IFN α 10, IFN α 21. La neutralización de los subtipos de IFN de tipo I o IFN α puede ser una reducción de al menos un 2 %, al menos un 3 %, al menos un 4 %, al menos un 5 %, al menos un 7 %, al menos un 8 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 % o al menos un 90 % de cualquiera de dichos al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cinco, al menos siete, al menos ocho o al menos diez de los subtipos. La neutralización de los subtipos de IFN de tipo I o IFN α puede ser una reducción en la expresión de genes de subtipo de IFN de tipo I o IFN α que está dentro de como máximo un 50 %, como máximo un 45 %, como máximo un 40 %, como máximo un 35 %, como máximo un 30 %, como máximo un 25 %, como máximo un 20 %, como máximo un 15 %, como máximo un 10 %, como máximo un 5 %, como máximo un 4 %, como máximo un 3 %, como máximo un 2 % o como máximo un 1 % de los niveles de expresión de esos subtipos de IFN de tipo I o IFN α en una muestra de control. Si el agente que se une a y modula la actividad de IFN α o la actividad de IFN de tipo I es un agente biológico, tal como un anticuerpo, el agente puede neutralizar los subtipos de IFN α o IFN de tipo I a dosis de 0,3 a 30 mg/kg, de 0,3 a 10 mg/kg, de 0,3 a 3 mg/kg, de 0,3 a 1 mg/kg, de 1 a 30 mg/kg, de 3 a 30 mg/kg, de 5 a 30 mg/kg, de 10 a 30 mg/kg, de 1 a 10 mg/kg, de 3 a 10 mg/kg o de 1 a 5 mg/kg.

El agente que se une a y modula la actividad de IFN de tipo I o IFN α puede, además o como alternativa, neutralizar la expresión de receptores de IFN α , IFNAR1 o IFNAR2 o ambos, o TNF α , o IFN γ , o receptores de IFN γ (IFNGR1, IFNGR2 o tanto IFNGR1 como IFNGR2). La neutralización de la expresión de receptores de IFN α , IFNAR1 o IFNAR2, o ambos, o TNF α , o IFN γ o receptores de IFN γ (IFNGR1, IFNGR2 o tanto IFNGR1 como IFNGR2) puede ser una reducción de al menos un 2 %, al menos un 3 %, al menos un 4 %, al menos un 5 %, al menos un 7 %, al menos un 8 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 % o al menos un 90 % de cualquiera de dichos al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cinco o al menos seis de estos genes. La neutralización de la expresión de receptores de IFN α , IFNAR1 o IFNAR2, o TNF α , o IFN γ o receptores de IFN γ (IFNGR1, IFNGR2, o tanto IFNGR1 como IFNGR2) es una reducción de la expresión de como máximo un 50 %, como máximo un 45 %, como máximo un 40 %, como máximo un 35 %, como máximo un 30 %, como máximo un 25 %, como máximo un 20 %, como máximo un 15 %, como máximo un 10 %, como máximo un 5 %, como máximo un 4 %, como máximo un 3 %, como máximo un 2 % o como máximo un 1 % de los niveles de expresión de estos genes en una muestra de control. Si el agente que se une a y modula la actividad de IFN de tipo I o IFN α es un agente biológico, tal como un anticuerpo, el agente puede neutralizar la expresión de los receptores de IFN α , IFNAR1 o IFNAR2, o TNF α o IFN γ , o receptores de IFN γ , IFNGR1 o IFNGR2 a dosis de 0,3 a 30 mg/kg, de 0,3 a 10 mg/kg, de 0,3 a 3 mg/kg, de 0,3 a 1 mg/kg, de 1 a 30 mg/kg, de 3 a 30 mg/kg, de 5 a 30 mg/kg, de 10 a 30 mg/kg, de 1 a 10 mg/kg, de 3 a 10 mg/kg, o de 1 a 5 mg/kg.

C. Muestras de pacientes

Las muestras también pueden obtenerse a partir de pacientes en los métodos de la divulgación. Las muestras incluyen cualquier fluido o tejido biológico, tal como sangre entera, saliva, orina, líquido sinovial, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, secreciones nasales, esputos, líquido amniótico, fluido de lavado broncoalveolar, células mononucleares de sangre periférica, glóbulos blancos totales, células de ganglio linfático, células de bazo, células de amígdala o piel. Las muestras pueden obtenerse por cualquier medio conocido en la técnica.

45 VI. Métodos de supervisión de la progresión de la enfermedad

En los métodos de supervisión de la progresión de la enfermedad de un paciente, pueden obtenerse muestras del paciente antes y después de la administración de un agente, por ejemplo, un agente que se une a y modula la actividad de IFN de tipo I o IFN α , o un agente que se une a y no modula la actividad de IFN de tipo I o IFN α , o una combinación de agentes que pueden o pueden no incluir un agente que se une a y modula la actividad de IFN de tipo I o IFN α . En las muestras se obtienen perfiles de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α (antes y después de la administración del agente). Los perfiles de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α en las muestras se comparan. La comparación puede ser del número de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α presentes en las muestras o puede ser de la cantidad de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α presentes en las muestras o cualquier combinación de éstas. Puede indicarse una variación que indique la eficacia del agente terapéutico si el número o nivel (o cualquier combinación de los mismos) de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α disminuye en la muestra obtenida después de la administración del agente terapéutico con respecto a la muestra obtenida antes de la administración del agente terapéutico. El número de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α regulados positivamente puede reducirse en al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 veces. El nivel de cualquier marcador PD inducible por IFN de tipo I o IFN α regulado positivamente dado puede reducirse al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 %. El número de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α regulados positivamente con niveles disminuidos puede ser al menos 1, al menos 2, al menos 3 o al menos 4. Cualquier combinación de número disminuido y nivel disminuido de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α

regulados positivamente puede indicar eficacia. Puede indicarse variación que indique eficacia del agente terapéutico si el número o nivel (o cualquier combinación de los mismos) de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α regulados negativamente disminuye en la muestra obtenida después de la administración del agente terapéutico con respecto a la muestra obtenida antes de la administración del agente terapéutico.

5 La muestra obtenida a partir del paciente puede obtenerse antes de una primera administración del agente, es decir, al paciente no se le ha administrado previamente el agente. Como alternativa, la muestra obtenida a partir del paciente puede obtenerse después de la administración del agente en el transcurso del tratamiento. Por ejemplo, el agente puede haberse administrado antes del inicio del protocolo de supervisión. Después de la administración del agente, puede obtenerse una muestra adicional del paciente y se comparan los marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α en las muestras. Las muestras pueden ser del mismo tipo o de un tipo diferente, por ejemplo, cada muestra obtenida puede ser una muestra de sangre, o cada muestra obtenida puede ser una muestra de suero. Los marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α detectados en cada muestra pueden ser iguales, o pueden coincidir sustancialmente, o pueden ser similares.

15 Las muestras pueden obtenerse en cualquier momento antes y después de la administración del agente terapéutico. La muestra obtenida después de la administración del agente terapéutico puede obtenerse al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 12 o al menos 14 días después de la administración del agente terapéutico. La muestra obtenida después de la administración del agente terapéutico puede obtenerse al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7 o al menos 8 semanas después de la administración del agente terapéutico. La muestra obtenida después de la administración del agente terapéutico puede obtenerse al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 6 meses después de la administración del agente terapéutico.

25 Pueden obtenerse muestras adicionales del paciente después de la administración del agente terapéutico. Pueden obtenerse al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al menos 20 o al menos 25 muestras del paciente para supervisar la progresión o regresión de la enfermedad o trastorno a lo largo del tiempo. La progresión de la enfermedad puede supervisarse durante un período de tiempo de al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 5 semanas, al menos 6 semanas, al menos 7 semanas, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, al menos 2 años, al menos 3 años, al menos 4 años, al menos 5 años, al menos 10 años, o durante la vida del paciente. Pueden obtenerse muestras adicionales del paciente a intervalos regulares tales como mensualmente, cada dos meses, una vez al trimestre, dos veces al año o a intervalos anuales. Las muestras pueden obtenerse del paciente después de la administración del agente a intervalos regulares. Por ejemplo, las muestras pueden obtenerse del paciente una semana después de cada administración del agente, o dos semanas después de cada administración del agente, o tres semanas después de cada administración del agente, o un mes después de cada administración del agente, o dos meses después de cada administración del agente. Como alternativa, pueden obtenerse múltiples muestras del paciente después de cada administración del agente.

40 De forma similar, puede supervisarse la progresión de la enfermedad en un paciente en ausencia de administración de un agente. Pueden obtenerse periódicamente muestras del paciente que tiene la enfermedad o trastorno. La progresión de la enfermedad puede identificarse si el número o tipo de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α aumenta en una muestra obtenida posteriormente con respecto a una muestra obtenida previamente. El número de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α puede aumentar en al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10. La progresión de la enfermedad puede identificarse si el nivel de cualquier marcador PD inducible por IFN de tipo I o IFN α regulado positivamente dado aumenta en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 %. La progresión de la enfermedad puede identificarse si el nivel de cualquier marcador PD inducible por IFN de tipo I o IFN α regulado negativamente dado disminuye en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 %. El número de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α regulados positivamente con niveles aumentados puede ser al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o al menos 35. El número de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α regulados negativamente con niveles disminuidos puede ser al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o al menos 35. Cualquier combinación de un número aumentado y nivel aumentado de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α regulado positivamente puede indicar progresión de la enfermedad. Como alternativa, o en combinación, cualquier combinación de número disminuido y nivel disminuido de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α regulado negativamente puede indicar progresión de la enfermedad. La regresión de la enfermedad también puede identificarse en un paciente que tiene una enfermedad o trastorno, no tratado por un agente. En este caso, puede identificarse regresión si el número de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α disminuye en una muestra obtenida posteriormente con respecto a una muestra obtenida previamente. El número de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α puede

disminuir en al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10. La regresión de la enfermedad puede identificarse si el nivel de cualquier marcador PD inducible por IFN de tipo I o IFN α regulado positivamente dado disminuye en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 %. Puede identificarse regresión de la enfermedad si el nivel de cualquier marcador PD inducible por IFN de tipo I o IFN α regulado negativamente dado aumenta en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 %. El número de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α regulados positivamente con niveles disminuidos puede ser al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o al menos 35. El número de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α regulados negativamente con niveles aumentados puede ser al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 35. La progresión de la enfermedad o la regresión de la enfermedad puede supervisarse mediante la obtención de muestras durante cualquier período de tiempo y a cualquier intervalo. La progresión de la enfermedad o la regresión de la enfermedad puede supervisarse mediante la obtención de muestras durante el transcurso de al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 5 semanas, al menos 6 semanas, al menos 7 semanas, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, al menos 2 años, al menos 3 años, al menos 4 años, al menos 5 años, al menos 10 años o a lo largo de la vida del paciente. La progresión de la enfermedad o la regresión de la enfermedad puede supervisarse mediante la obtención de muestras al menos mensualmente, cada dos meses, una vez al trimestre, dos veces al año o anualmente. No es necesario obtener las muestras a intervalos estrictos.

25 VII. Kits y sondas

La divulgación también incluye kits y sondas. Las sondas pueden ser cualquier molécula que detecte cualquier expresión o actividad de cualquier gen que pueda incluirse en un perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α .

30

VIII. Métodos de detección de la actividad de IFN

La divulgación también incluye métodos para detectar la actividad de IFN. Estos métodos pueden emplear células que comprenden una secuencia polinucleotídica que comprende un gen indicador bajo el control de un elemento de respuesta estimulado por interferón. Las células que comprenden la secuencia polinucleotídica pueden ser cualquier célula susceptible de transfección o transformación con una secuencia polinucleotídica y que puede mantenerse en cultivo. Estas células incluyen células animales, células bacterianas, células de levadura, células de insecto o células vegetales. Estas células pueden ser adherentes o pueden crecer en suspensión. Si las células son células animales, pueden proceder de una línea celular conocida tal como HeLa, COS, NIH3T3, AGS, 293, CHO, Huh-7, HUVEC, MCF-7, C6, BHK-21, BNL CL 2, C2C12, HepG2 y ATDC5. Se conocen innumerables líneas celulares y pueden obtenerse por los expertos en la materia. Las células, como alternativa, pueden ser células primarias que se han inmortalizado o no.

40

Las células pueden comprender una secuencia polinucleotídica que comprende un gen indicador bajo el control de un elemento de respuesta estimulado por interferón. La secuencia polinucleotídica puede estar integrada de forma estable en el ADN de la célula o puede ser un elemento extracromosómico que está de forma estable o transitoria en la célula. El polinucleótido puede haberse introducido en la célula como una molécula de polinucleótido desnuda, una molécula de polinucleótido complejada con lípidos u otras moléculas, o un polinucleótido en una partícula de virus.

50

Si el polinucleótido se introdujo como una molécula de polinucleótido desnuda, el polinucleótido puede haber sido una molécula lineal o circular. Los ejemplos no limitantes de moléculas de polinucleótido circulares incluyen plásmidos y cromosomas artificiales. Estos vectores pueden escindirse con enzimas, por ejemplo, para generar moléculas de polinucleótido lineales.

55

Además, si el polinucleótido se introdujo como un polinucleótido desnudo, puede haberse introducido en las células por cualquiera de muchas técnicas bien conocidas en este campo. Estas técnicas incluyen, pero sin limitación, electroporación, microinyección y liberación balística de partículas. Véase también, por ejemplo, Loeffler y Behr, 1993, *Meth. Enzymol.* 217: 599-618; Cohen *et al.*, 1993, *Meth. Enzymol.* 217: 618-644; *Clin. Pharma. Ther.* 29: 69-92 (1985), Sambrook, *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2^a, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989 y Ausubel *et al.*, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., N. Y., N. Y. (1987-2001).

60

Si el polinucleótido se introdujo como un complejo con lípidos o liposomas, también puede haberse introducido por una de muchas técnicas conocidas por el experto en la materia. Los lípidos o liposomas comprenden una mezcla de partículas de grasa o lípidos que se unen al ADN o ARN para proporcionar un vehículo de liberación recubierto

65

hidrófobo. Los liposomas adecuados pueden comprender cualquiera de los materiales de liposomas fosfolípidos sintéticos o naturales convencionales, incluyendo fosfolípidos de fuentes naturales tales como huevo, fuentes vegetales o animales tales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, esfingomiélin, fosfatidilserina o fosfatidilinositol. También pueden usarse fosfolípidos sintéticos, por ejemplo, dimiristoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina y fosfatidiletanolaminas sintéticas correspondientes y fosfatidilgliceroles. También están disponibles para el experto en la materia lípidos o liposomas que pueden conjugarse con el vector. Los ejemplos de reactivos de transfección de lípidos o liposomas disponibles en el mercado conocidos por los expertos en la materia incluyen LIPOFECTAMINE™ (Invitrogen), GENEJUICE® (Novagen), GENEJAMMER® (Strata-gen), FUGENE®HD (Roche), MEGAFECTIN™ (Qbiogene), SUPERFECT® (Qiagen) y EFFECTENE® (Qiagen).

Si el polinucleótido se introdujo como un complejo con otras moléculas, puede haberse compactado en una nanosfera. Se describen complejos de polinucleótidos compactados en las Patentes de Estados Unidos 5.972.901, 6.008.336 y 6.077.835. Se describen nanoesferas en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.718.905 y 6.207.195. Estos complejos de polinucleótido compactados y nanoesferas que complejan ácidos nucleicos utilizan cationes poliméricos. Los cationes poliméricos típicos incluyen gelatina, poli-L-lisina y quitosano. Como alternativa, el polinucleótido puede haberse complejado con DEAE-dextrano, o transfectado usando técnicas tales como coprecipitación con fosfato cálcico o coprecipitación con cloruro cálcico.

Si el polinucleótido se introdujo asociado con un virus, el virus puede ser cualquier virus adecuado bien conocido para la liberación de polinucleótidos. Los ejemplos de virus que pueden usarse como vectores incluyen adenovirus, virus adenoasociado, lentivirus, retrovirus, herpes virus (por ejemplo, herpes virus simplex), vaccinia virus, papovirus, virus Sendai, virus SV40, virus sincitial respiratorio, etc.

La secuencia polinucleotídica puede incluir un gen indicador y un elemento de respuesta estimulado por interferón. El gen indicador puede ser uno cualquiera de luciferasa, cloranfenicol acetil transferasa, β-galactosidasa, proteína fluorescente verde, β-glucuronidasa o fosfatasa alcalina placentaria secretada. Se conocen variaciones de muchos de estos genes indicadores, por ejemplo, proteína fluorescente verde y luciferasa, y pueden identificarse y/o producirse fácilmente por los expertos en la materia. Los expertos en la materia también conocerán otros genes indicadores además de los indicados y se pueden obtener fácilmente. Los expertos en la materia también conocen elementos de respuesta estimulados por interferón. Pueden obtenerse a partir de vendedores comerciales tales como Stratagene, Clontech y Biomyx. También se han presentado, por ejemplo, en Alcantara *et al.* (Nuc. Acid Res. 30 (2002): 2068-2075 y Kirchoff *et al.* (Oncogene 18 (1999): 3725-3736).

Las células empleadas en el ensayo pueden incubarse con una muestra. La muestra puede obtenerse a partir de un paciente o a partir de un vendedor con muestras de pacientes, o puede usarse una muestra de control para la calibración o como control. Si la muestra se obtiene a partir de un paciente, puede ser cualquier fluido o tejido biológico, tal como sangre entera, saliva, orina, líquido sinovial, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, secreciones nasales, esputos, líquido amniótico, fluido de lavado broncoalveolar, células mononucleares de sangre periférica, glóbulos blancos totales, células de ganglios linfáticos, células de bazo, células de amígdala o piel.

La expresión del gen indicador se detecta por cualquier medio bien conocido en la técnica. La expresión, incluso si es "0" indica actividad de IFN en la muestra. Un experto en la materia puede cuantificar adicionalmente cualquier nivel de expresión del gen indicador que después puede correlacionarse con el nivel de actividad de IFN en la muestra.

Los solicitantes proporcionan un conjunto de realizaciones no limitantes para describir algunos de los aspectos de la divulgación.

Realizaciones

Realización 1. Un método para tratar a un paciente que tiene una enfermedad o trastorno mediado por IFN de tipo I o IFNα que comprende:

administrar un agente que se une a y modula la actividad de IFN de tipo I o IFNα;

en el que el paciente comprende un perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFNα;

y en el que el agente neutraliza el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFNα del paciente.

Realización 2. Un método para tratar a un paciente con una enfermedad autoinmunitaria que comprende un perfil de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFNα moderado o fuerte, que comprende:

administrar un agente que se une a y modula la actividad de IFN de tipo I o IFNα;

en el que el agente neutraliza el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α del paciente.

5 Realización 3. Un método para neutralizar un perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α en un paciente que tiene una enfermedad o trastorno, que comprende:

administrar un agente que se une a y modula la actividad de IFN de tipo I o IFN α en el paciente;

10 en el que el agente neutraliza el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α del paciente.

Realización 4. El método de una cualquiera de las realizaciones 1 a 3, que comprende además detectar la neutralización del perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α del paciente.

15 Realización 5. El método de una cualquiera de las realizaciones 1 a 4, en el que el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α comprende transcritos de genes de marcadores PD.

20 Realización 6. El método de una cualquiera de las realizaciones 1 a 4, en el que el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α comprende polipéptidos expresados a partir de genes de marcadores PD.

25 Realización 7. El método de una cualquiera de las realizaciones 1 a 6, en el que el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α comprende la expresión o actividad regulada positivamente de un conjunto de genes elegidos entre:

(a) IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

(b) IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

30 (c) IFI27, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

(d) IFI27, IFI44, IFI6 y RSAD2;

35 (e) IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2; y

(f) IFI27, IFI44, IFI44L e IFI6.

40 Realización 8. El método de una cualquiera de las realizaciones 1 a 6, en el que el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α consiste en la expresión o actividad regulada positivamente de un conjunto de genes elegidos entre:

(a) IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

45 (b) IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

(c) IFI27, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

50 (d) IFI27, IFI44, IFI6 y RSAD2;

(e) IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2; y

(f) IFI27, IFI44, IFI44L e IFI6

55 Realización 9. El método de la realización 7 u 8 en el que la expresión o actividad regulada positivamente de un conjunto de genes se calcula como un promedio de aumento en veces en la expresión o actividad del conjunto de genes.

60 Realización 10. El método de la realización 9 en el que el promedio de aumento en veces en la expresión o actividad del conjunto de genes está comprendido entre al menos aproximadamente 3 y al menos aproximadamente 15, entre al menos aproximadamente 3 y al menos aproximadamente 10 o entre al menos aproximadamente 3 y al menos aproximadamente 5.

65 Realización 11. El método de la realización 9, en el que el promedio de aumento en veces en la expresión o actividad del conjunto de genes es al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 2,5, al menos

aproximadamente 3, al menos aproximadamente 3,5, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 4,5, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 5,5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 6,5, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9 o al menos aproximadamente 10.

5 Realización 12. El método de una cualquiera de las realizaciones 1 a 11 en el que el agente es un agente biológico.

10 Realización 13. El método de la realización 12 en el que el agente es un anticuerpo.

Realización 14. El método de la realización 13, en el que el anticuerpo es MEDI-545.

15 Realización 15. El método de la realización 13, en el que el anticuerpo es específico para uno o más subtipos de IFN de tipo I o IFN α , pero no es MEDI-545.

Realización 16. El método de una cualquiera de las realizaciones 1 a 15, en el que la administración del agente alivia uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno.

20 Realización 17. El método de una cualquiera de las realizaciones 13 a 16, en el que el anticuerpo se administra a una dosis comprendida entre aproximadamente 0,03 y 30 mg/kg.

Realización 18. El método de la realización 17, en el que el anticuerpo se administra a una dosis comprendida entre 0,3 y 3 mg/kg o entre 0,03 y 1 mg/kg.

25 Realización 19. El método de una cualquiera de las realizaciones 1 a 18, en el que el agente neutraliza el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α del paciente en al menos un 10 %, en al menos un 20 %, en al menos un 30 %, en al menos un 40 % o en al menos un 50 %.

30 Realización 20. El método de una cualquiera de las realizaciones 1 a 19, en el que la enfermedad o trastorno es uno de lupus, nefritis lúpica, dermatomiositis, polimiositis, psoriasis, SSc, vasculitis, sarcoidosis, síndrome de Sjogren o miositis inflamatoria idiopática.

Realización 21. El método de la realización 20, en el que la enfermedad o trastorno es lupus.

35 Realización 22. El método de la realización 20, en el que la enfermedad o trastorno es psoriasis.

Realización 23. El método de una cualquiera de las realizaciones 1 a 22, en el que el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α comprende la expresión o actividad regulada positivamente de al menos los subtipos de IFN α 1, 2, 8 y 14.

40 Realización 24. Un método para supervisar o pronosticar la progresión de una enfermedad autoinmunitaria de un paciente que comprende:

45 obtener un primer perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α en una primera muestra de un paciente.

Realización 25. El método de la realización 24, en el que el primer perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α es un perfil fuerte y el pronóstico del paciente es progresión de la enfermedad.

50 Realización 26. El método de la realización 25, en el que la enfermedad autoinmunitaria es LES y la progresión es un brote de LES.

Realización 27. El método de la realización 26, en el que el primer perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α es un perfil débil y el pronóstico del paciente es regresión de la enfermedad.

55 Realización 28. El método de la realización 24, que además comprende:

60 obtener un segundo perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α en una segunda muestra de un paciente;

en el que un aumento en el número o nivel de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α en el segundo perfil de expresión con respecto al primero sirve de pronóstico para la progresión de la enfermedad;

o

65 en el que una reducción en el número o nivel de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α en el segundo perfil de expresión con respecto al primero sirve de pronóstico de regresión de la enfermedad.

Realización 29. El método de una cualquiera de las realizaciones 26 a 28, en el que el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α comprende transcritos de genes de marcadores PD.

5 Realización 30. El método de una cualquiera de las realizaciones 24 a 28, en el que el tipo de perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α comprende polipéptidos expresados a partir de genes de marcadores PD.

10 Realización 31. El método de una cualquiera de las realizaciones 24 a 28, en el que el tipo de perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α comprende la expresión o actividad de un conjunto de genes elegidos entre:

(a) IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

15 (b) IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

(c) IFI27, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

20 (d) IFI27, IFI44, IFI6 y RSAD2;

(e) IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2; y

(f) IFI27, IFI44, IFI44L e IFI6.

25 Realización 32. El método de una cualquiera de las realizaciones 24 a 28, en el que el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α consiste en la expresión o actividad de un conjunto de genes elegidos entre:

30 (a) IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

(b) IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

35 (c) IFI27, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

(d) IFI27, IFI44, IFI6 y RSAD2;

40 (e) IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2; y

(f) IFI27, IFI44, IFI44L e IFI6.

45 Realización 33. Un método para supervisar la progresión de la enfermedad de un paciente que recibe tratamiento con un agente terapéutico que se une a y modula la actividad de IFN α , que comprende:

obtener un primer perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α en una primera muestra del paciente;

50 administrar un agente terapéutico que se une a y modula la actividad del IFN α ;

obtener un segundo perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α en una segunda muestra del paciente; y

55 comparar el primer y el segundo perfiles de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α ,

en el que una variación en el primer y el segundo perfiles de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α indica un nivel de eficacia del agente terapéutico que se une a y modula la actividad de IFN α .

60 Realización 34. El método de la realización 33, en el que el primer perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α comprende la expresión o actividad regulada positivamente de un conjunto de genes elegidos entre:

65 (a) IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

(b) IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

(c) IFI27, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

(d) IFI27, IFI44, IFI6 y RSAD2;

5 (e) IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2; y

(f) IFI27, IFI44, IFI44L e IFI6.

10 Realización 35. El método de la realización 33, en el que el primer perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN de tipo I o IFN α consiste en la expresión o actividad regulada positivamente de un conjunto de genes elegidos entre:

(a) IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

15 (b) IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

(c) IFI27, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

20 (d) IFI27, IFI44, IFI6 y RSAD2;

(e) IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2; y

(f) IFI27, IFI44, IFI44L e IFI6.

25 Realización 36. El método de la realización 34 o 35, en el que la variación es una reducción en la expresión regulada positivamente de los niveles de actividad de los genes.

30 Realización 37. El método de una cualquiera de las realizaciones 33 a 35, en el que la enfermedad o trastorno es uno de lupus, nefritis lúpica, dermatomiositis, polimiositis, psoriasis, SSc, vasculitis, sarcoidosis, síndrome de Sjogren o miositis inflamatoria idiopática.

Realización 38. El método de la realización 37, en el que la enfermedad es lupus.

35 Realización 39. El método de una cualquiera de las realizaciones 33 a 38, en el que el agente terapéutico es una molécula pequeña o un agente biológico.

Realización 40. El método de la realización 39, en el que el agente biológico es un anticuerpo.

40 Realización 41. El método de la realización 40, en el que el anticuerpo es MEDI-545 y/o un anticuerpo específico para uno o más subtipos de IFN de tipo I o IFN α , pero no es MEDI-545.

Realización 42. El método de una cualquiera de las realizaciones 33 a 41, en el que el primer perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α se obtiene antes de la administración del agente terapéutico.

45 Realización 43. El método de una cualquiera de las realizaciones 33 a 41, en el que el primer perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α se obtiene en el momento de la administración del agente terapéutico.

50 Realización 44. El método de una cualquiera de las realizaciones 33 a 43, en el que la primera y la segunda muestra son sangre entera o suero.

Realización 45. El método de una cualquiera de las realizaciones 33 a 44, que comprende además obtener un tercer perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α en una tercera muestra del paciente.

55 Realización 46. El método de la realización 45, que comprende además obtener un cuarto perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α en una cuarta muestra del paciente.

Realización 47. El método de la realización 46, que comprende además obtener un quinto perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α en una quinta muestra del paciente.

60 Realización 48. El método de la realización 47, que comprende además obtener un sexto perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α en una sexta muestra del paciente.

65 Realización 49. El método de una cualquiera de las realizaciones 33 a 48, en el que la segunda muestra se obtiene al menos una semana, al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos un mes o al menos dos meses después de la administración del agente terapéutico.

Realización 50. El método de la realización 45, en el que la tercera muestra se obtiene al menos 2 días, al menos 5 días, al menos una semana, al menos 2 semanas, al menos tres semanas, al menos un mes o al menos dos meses después de obtener la segunda muestra.

5 Realización 51. El método de la realización 46, en el que la cuarta muestra se obtiene al menos dos días, al menos cinco días, al menos una semana, al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos un mes o al menos dos meses después de obtener la tercera muestra.

10 Realización 52. El método de la realización 47, en el que la quinta muestra se obtiene al menos dos días, al menos cinco días, al menos una semana, al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos un mes o al menos dos meses después de obtener la cuarta muestra.

15 Realización 53. El método de una cualquiera de las realizaciones 33 a 52, en el que la variación es una reducción en la expresión o actividad regulada positivamente del gen.

20 Realización 54. El método de la realización 53, en el que la reducción es al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 %.

Realización 55. Un método para identificar a un paciente como candidato de un agente terapéutico que se une a y modula la actividad de IFN α , que comprende:

25 detectar la presencia o ausencia de un perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α en una muestra del paciente,

en el que la detección de la presencia del perfil de expresión de marcadores PD inducidos por IFN α identifica al paciente como un candidato para el agente terapéutico que se une a y modula la actividad de IFN α .

30 Realización 56. El método de la realización 55, en el que el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α comprende la expresión o actividad regulada positivamente de un conjunto de genes elegidos entre:

(a) IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

35 (b) IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

(c) IFI27, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

40 (d) IFI27, IFI44, IFI6 y RSAD2;

(e) IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2; y

(f) IFI27, IFI44, IFI44L e IFI6.

45 Realización 57. El método de la realización 55, en el que el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α consiste en la expresión o actividad regulada positivamente de un conjunto de genes elegidos entre:

(a) IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

50 (b) IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

(c) IFI27, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

55 (d) IFI27, IFI44, IFI6 y RSAD2;

(e) IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2; y

(f) IFI27, IFI44, IFI44L e IFI6.

60 Realización 58. El método de la realización 56 o 57, en el que la expresión o actividad regulada positivamente de un conjunto de genes se calcula como un promedio de aumento en veces en la expresión o actividad del conjunto de genes.

65 Realización 59. El método de la realización 58, en el que el promedio de aumento en veces en la expresión o actividad del conjunto de genes es al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3 y al menos aproximadamente 4.

- 5 Realización 60. El método de la realización 59, en el que el promedio de aumento en veces en la expresión o actividad del conjunto de genes es al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 2,5, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 3,5, al menos aproximadamente 4, al menos, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 5,5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 6,5, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 7,5, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 10.
- 10 Realización 61. El método de una cualquiera de las realizaciones 55 a 60, en el que al paciente se le ha diagnosticado un trastorno elegido entre lupus, nefritis lúpica, dermatomiositis, polimiositis, psoriasis, SSc, vasculitis, sarcoidosis, síndrome de Sjogren o miositis inflamatoria idiopática.
- Realización 62. El método de la realización 61, en el que el trastorno es lupus.
- 15 Realización 63. El método de una cualquiera de las realizaciones 55 a 62, en el que el agente terapéutico es una molécula pequeña o un agente biológico.
- Realización 64. El método de la realización 63, en el que el agente biológico es un anticuerpo.
- 20 Realización 65. El método de la realización 64, en el que el anticuerpo es MEDI-545.
- Realización 66. El método de la realización 64, en el que el anticuerpo es específico para uno o más subtipos de IFN de tipo I o IFN α , pero no es MEDI-545.
- 25 Realización 67. El método de una cualquiera de las realizaciones 55 a 66, en el la expresión o actividad regulada positivamente comprende un aumento en los niveles de ARNm de uno o más de los genes.
- Realización 68. El método de una cualquiera de las realizaciones 55 a 66, en el que la expresión o actividad regulada positivamente comprende un aumento en los niveles de proteína de uno o más de los genes.
- 30 Realización 69. El método de una cualquiera de las realizaciones 55 a 66, en el que la expresión o actividad regulada positivamente comprende un aumento en la actividad enzimática de una proteína expresada a partir de uno o más de los genes.
- 35 Realización 70. El método de una cualquiera de las realizaciones 55 a 69, en el que la muestra es sangre entera.
- Realización 71. Un método para diagnosticar un trastorno asociado con un aumento de los niveles de IFN α en un paciente, que comprende:
- 40 detectar la presencia o ausencia de un perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α en una muestra del paciente,
- en el que la detección de la presencia del perfil de expresión de marcadores PD inducidos por IFN α identifica al paciente como un paciente que tiene un trastorno asociado con niveles aumentados de IFN α .
- 45 Realización 72. El método de la realización 71, en el que el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α comprende la expresión o actividad regulada positivamente de un conjunto de genes elegidos entre:
- 50 (a) IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;
- (b) IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;
- (c) IFI27, IFI44L, IFI6 y RSAD2;
- 55 (d) IFI27, IFI44, IFI6 y RSAD2;
- (e) IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2; y
- (f) IFI27, IFI44, IFI44L e IFI6.
- 60 Realización 73. El método de la realización 71, en el que el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α consiste en la expresión o actividad regulada positivamente de un conjunto de genes elegidos entre:
- 65 (a) IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;
- (b) IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

(c) IFI27, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

(d) IFI27, IFI44, IFI6 y RSAD2;

5 (e) IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2; y

(f) IFI27, IFI44, IFI44L e IFI6.

10 Realización 74. El método de la realización 72 o 73, en el que la expresión o actividad regulada positivamente de un conjunto de genes se calcula como un promedio de aumento en veces en la expresión o actividad del conjunto de genes.

15 Realización 75. El método de la realización 74, en el que el promedio de aumento en veces en la expresión o actividad del conjunto de genes está comprendido entre al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3 y al menos aproximadamente 4.

20 Realización 76. El método de la realización 74, en el que el promedio de aumento en veces en la expresión o actividad del conjunto de genes es al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 2,5, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 3,5, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 4,5, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 5,5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 6,5, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9 o al menos aproximadamente 10.

25 Realización 77. El método de una cualquiera de las realizaciones 72 a 76, en el que la enfermedad o trastorno es uno de lupus, nefritis lúpica, dermatomiositis, polimiositis, psoriasis, SSc, vasculitis, sarcoidosis, síndrome de Sjogren o miositis inflamatoria idiopática.

30 Realización 78. El método de la realización 77, en el que el trastorno es lupus.

Realización 79. El método de una cualquiera de las realizaciones 72 a 78, en el que la expresión o actividad regulada positivamente comprende un aumento en los niveles de ARNm de uno o más de los genes.

35 Realización 80. El método de una cualquiera de las realizaciones 72 a 78, en el que la expresión o actividad regulada positivamente comprende un aumento en los niveles de proteína de uno o más de los genes.

40 Realización 81. El método de una cualquiera de las realizaciones 72 a 78, en el que la expresión o actividad regulada positivamente comprende un aumento en la actividad enzimática de una proteína expresada a partir de uno o más de los genes.

Realización 82. Un método para identificar un agente terapéutico candidato para tratar trastornos mediados por IFN α , que comprende:

45 poner en contacto células que comprenden un perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α con un agente; y

detectar la presencia o ausencia de un cambio en el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α de las células,

50 en el que la presencia de un cambio que comprende una reducción en la regulación positiva de los genes del perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α indica que el agente es un agente terapéutico candidato.

55 Realización 83. El método de la realización 82, en el que el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α comprende la expresión o actividad regulada positivamente de un conjunto de genes elegidos entre:

(a) IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

60 (b) IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

(c) IFI27, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

(d) IFI27, IFI44, IFI6 y RSAD2;

65 (e) IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2; y

(f) IFI27, IFI44, IFI44L e IFI6.

Realización 84. El método de la realización 82, en el que el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α consiste en la expresión o actividad regulada positivamente de un conjunto de genes elegidos entre:

5

(a) IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

(b) IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

10

(c) IFI27, IFI44L, IFI6 y RSAD2;

(d) IFI27, IFI44, IFI6 y RSAD2;

15

(e) IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2; y

(f) IFI27, IFI44, IFI44L e IFI6.

Realización 85. El método de la realización 83 u 84, en el que la expresión o actividad regulada positivamente de un conjunto de genes se calcula como un promedio de aumento en veces en la expresión o actividad del conjunto de genes.

20

Realización 86. El método de la realización 85, en el que el promedio de aumento en veces en la expresión o actividad del conjunto de genes está comprendido entre al menos aproximadamente 3 y al menos aproximadamente 15, entre al menos aproximadamente 3 y al menos aproximadamente 10 o entre al menos aproximadamente 3 y al menos aproximadamente 5.

25

Realización 87. El método de la realización 85, en el que el promedio de aumento en veces en la expresión o actividad del conjunto de genes es al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 2,5, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 3,5, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 4,5, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 5,5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 6,5, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9 o al menos aproximadamente 10.

30

Realización 88. El método de una cualquiera de las realizaciones 83 a 87, en el que las células se obtienen a partir de un paciente que comprende un trastorno asociado con niveles aumentados de IFN α .

35

Realización 89. El método de una cualquiera de las realizaciones 83 a 87, en el que las células son células tratadas con IFN α para inducir el perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α .

40

Realización 90. El método de una cualquiera de las realizaciones 83 a 89, en el que la regulación positiva de los genes del perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α comprende un aumento en los niveles de ARNm de uno o más de los genes.

45

Realización 91. El método de una cualquiera de las realizaciones 83 a 89, en el que la regulación positiva de los genes del perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α comprende un aumento en los niveles de proteína de uno o más de los genes.

50

Realización 92. El método de una cualquiera de las realizaciones 83 a 89, en el que la regulación positiva de los genes del perfil de expresión de marcadores PD inducibles por IFN α comprende un aumento en la actividad enzimática de una proteína expresada a partir de uno o más de los genes.

55

Realización 93. Un conjunto de cebadores que comprende polinucleótidos que amplifican y detectan específicamente la expresión de uno cualquiera de los siguientes conjuntos de genes:

55

(a) IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o

(b) IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o

60

(c) IFI27, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o

(d) IFI27, IFI44, IFI6 y RSAD2; o

(e) IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2; o

65

(f) IFI27, IFI44, IFI44L e IFI6.

Realización 94. El conjunto de cebadores de la realización 93 que comprende además cebadores para amplificar y detectar 18S, ACTB y GAPDH.

5 Realización 95. Un conjunto de cebadores que consiste en polinucleótidos que detectan específicamente la expresión de uno cualquiera de los conjuntos de genes:

(a) IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o

10 (b) IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o

(c) IFI27, IFI44L, IFI6 y RSAD2; o

(d) IFI27, IFI44, IFI6 y RSAD2; o

15 (e) IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2; o

(f) IFI27, IFI44, IFI44L e IFI6.

20 Realización 96. Las realizaciones 93 y 94, en las que el conjunto de cebadores tiene secuencias de SEQ ID NO 1-24.

Realización 96. Cualquiera de las realizaciones 1-95, en las que IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2 tienen las secuencias de SEQ ID NO: 25-32.

25 Realización 97. Un kit que comprende los cebadores de las realizaciones 93-96.

Realización 98. Cualquiera de las realizaciones 1-96, en las que la expresión aumentada es la media o mediana de la expresión aumentada en los niveles de ARNm de IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2.

30 Realización 99. Un método para identificar a un sujeto adecuado para el tratamiento con un agente terapéutico que modula la actividad del interferón de tipo 1, que comprende detectar niveles aumentados de ARNm de al menos cuatro de IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2 en una muestra del sujeto, en el que un aumento en el ARNm de al menos aproximadamente cuatro veces indica un sujeto adecuado para el tratamiento con el agente.

35 Realización 100. El método de la realización 99, en el que el ARNm está aumentado con respecto al ARNm de al menos cuatro de IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2 en muestras reunidas procedentes de pacientes sanos.

40 Realización 101. El método de cualquiera de las realizaciones 99 o 100, en el que el nivel aumentado de ARNm está aumentado con respecto al ARNm de uno o más genes de control presentes en la muestra.

Realización 102. El método de cualquiera de las realizaciones 99-101, en el que dichos uno o más genes de control se eligen entre ACTB, GAPDH y ARNr 18S.

45 Realización 103. El método de cualquiera de las realizaciones 99-102, en el que se detecta un nivel aumentado de ARNm de IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2.

Realización 104. El método de cualquiera de las realizaciones 99-103, en el que el agente se elige entre un anticuerpo anti-interferón alfa y un anticuerpo anti-receptor de interferón alfa.

50 Realización 105. El método de la realización de cualquiera de 99 a 104, en el que el anticuerpo anti-interferón es sifalimumab.

55 Realización 106. El método de la realización de cualquiera de 99-105, en el que el anticuerpo anti-interferón no es sifalimumab.

Realización 107. El método de la realización de cualquiera de 99-106, en el que la detección del ARNm de al menos IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2 comprende

60 1) aislar ARN a partir de una muestra obtenida del sujeto;

2) sintetizar ADNc a partir del ARN;

65 3) hibridar el ADNc con oligonucleótidos que hibridan con secuencias de ácido nucleico de las SEQ ID NO: 25-32; y

4) amplificar el ADNc y detectar los productos amplificados.

Realización 108. El método de la realización de cualquiera de 99-107, en el que los oligonucleótidos se eligen entre oligonucleótidos que tienen las secuencias de SEQ ID NO: 13-24.

5 Realización 109. Un método para identificar a un sujeto adecuado para el tratamiento con un agente terapéutico que modula la actividad del interferón de tipo 1, que comprende detectar un nivel aumentado de ARNm de al menos cuatro de IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2 en una muestra del sujeto, en el que el nivel aumentado de ARNm se calcula de acuerdo con el siguiente algoritmo:

$$\Delta Ct_{IFN} = \frac{(Ct_{IFI44} - Ct_{REF}) + (Ct_{IFI44L} - Ct_{REF}) + (Ct_{IFI27} - Ct_{REF}) + (Ct_{RSAD2} - Ct_{REF})}{4};$$

10 en el que

$$\Delta Ct_{REF} = \frac{Ct_{ACTB} + Ct_{GAPDH} + Ct_{18S}}{3}$$

15 y en el que un ΔCt_{IFN} de aproximadamente 7,6 indica un sujeto adecuado para el tratamiento con el agente.

Realización 110. El método de la realización de cualquiera de 99-109, en el que el agente se elige entre un anticuerpo anti-interferón alfa y un anticuerpo anti-receptor de interferón alfa.

20 Realización 111. El método de la realización de cualquiera de 99-110, en el que el anticuerpo anti-interferón es sifalimumab.

Realización 112. El método de la realización de cualquiera de 99-111, en el que el anticuerpo anti-interferón no es sifalimumab.

25 Realización 113. El método de la realización de cualquiera de 99-112, en el que la detección del ARNm de al menos IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2 comprende:

- 30
- 1) aislar ARN a partir de una muestra obtenida del sujeto;
 - 2) sintetizar ADNc a partir del ARN;
 - 3) hibridar el ADNc con oligonucleótidos que hibridan con secuencias de ácido nucleico de las SEQ ID NO: 25-35; y
 - 4) amplificar el ADNc y detectar los productos amplificados.

35 Realización 114. El método de la realización de cualquiera de 99-113, en el que los oligonucleótidos se eligen entre oligonucleótidos que tienen las secuencias de SEQ ID NO: 1-24.

Realización 115. Un método para tratar a un sujeto con un agente terapéutico que modula la actividad del interferón de tipo 1 que comprende:

- 40
- a) identificar un sujeto adecuado para el tratamiento mediante la detección de niveles aumentados de ARNm de al menos cuatro de IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2 en una muestra del sujeto, en el que un aumento en el ARNm de al menos 4 veces indica un sujeto adecuado para el tratamiento; y
 - b) administrar el agente terapéutico.

45 Realización 116. El método de la realización de cualquiera de 99-115, en el que el aumento de ARNm es con respecto al ARNm de al menos cuatro de IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2 en muestras reunidas procedentes de pacientes sanos.

50 Realización 117. El método de la realización de cualquiera de 99-116, en el que el aumento de ARNm es con respecto al ARNm de uno o más genes de control presentes en la muestra.

Realización 118. El método de la realización de cualquiera de 99-117, en el que dichos uno o más genes de control se eligen entre ACTB, GAPDH y ARNr 18S.

55 Realización 119. El método de la realización de cualquiera de 99-118, en el que se detecta un aumento de ARNm de IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2.

60 Realización 120. El método de la realización de cualquiera de 99-119, en el que el agente se elige entre un anticuerpo anti-interferón alfa y un anticuerpo anti-receptor del interferón alfa.

Realización 121. El método de la realización de cualquiera de 99-120, en el que el anticuerpo anti-interferón es sifalimumab.

5 Realización 122. El método de la realización de cualquiera de 99-121, en el que el anticuerpo anti interferón no es sifalimumab.

Realización 123. El método de la realización de cualquiera de 99-122, en el que la detección del ARNm de al menos IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2 comprende

- 10 1) aislar ARN a partir de una muestra obtenida del sujeto;
- 2) sintetizar ADNc a partir del ARN;
- 15 3) hibridar el ADNc con oligonucleótidos que hibridan con secuencias de ácido nucleico de las SEQ ID NO: 25-32; y
- 4) amplificar el ADNc y detectar los productos amplificados.

20 Realización 124. El método de la realización de cualquiera de 99-123, en el que los oligonucleótidos se eligen entre oligonucleótidos que tienen las secuencias de SEQ ID NO: 13-24.

Realización 125. Un método para identificar un sujeto adecuado para el tratamiento con un agente terapéutico que modula la actividad del interferón de tipo 1 que comprende

- 25 a) detectar un aumento de ARNm de al menos cuatro de IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2 en una muestra del sujeto, en el que el aumento del ARNm se calcula de acuerdo con el siguiente algoritmo

$$\Delta Ct_{IFN} = \frac{(Ct_{IFI44} - Ct_{REF}) + (Ct_{IFI44L} - Ct_{REF}) + (Ct_{IFI27} - Ct_{REF}) + (Ct_{RSAD2} - Ct_{REF})}{4} ;$$

30 en el que

$$\Delta Ct_{REF} = \frac{Ct_{ACTB} + Ct_{GAPDH} + Ct_{18S}}{3}$$

- 35 y en el que un ΔCt_{IFN} de aproximadamente 7,6 indica un sujeto adecuado para el tratamiento con un agente terapéutico que modula la actividad de IFN α ; y
- b) administrar el agente terapéutico.

40 Realización 126. El método de la realización de cualquiera de 99-125, en el que el agente se elige entre un anticuerpo anti-interferón alfa y un anticuerpo anti-receptor del interferón alfa.

Realización 127. El método de la realización de cualquiera de 99-126, en el que el anticuerpo anti-interferón es sifalimumab.

45 Realización 128. El método de la realización de cualquiera de 99-127, en el que el anticuerpo anti-interferón no es sifalimumab.

Realización 129. El método de la realización de cualquiera de 99-128, en el que la detección del ARNm de al menos IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2 comprende:

- 50 1) aislar ARN a partir de una muestra obtenida del sujeto;
- 2) sintetizar ADNc a partir del ARN;
- 3) hibridar el ADNc con oligonucleótidos que hibridan con secuencias de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 25-35; y
- 55 4) amplificar el ADNc y detectar los productos amplificados.

Realización 130. El método de la realización de cualquiera de 99-129, en el que los oligonucleótidos se eligen entre oligonucleótidos que tienen las secuencias de SEQ ID NO: 1-24.

60 El conjunto de ejemplos que se presentan a continuación se proporcionan solo con fines ilustrativos y la divulgación no debe considerarse limitada por estos ejemplos.

Ejemplos

IX. Ejemplo 1: desarrollo de un ensayo de diagnóstico para agentes terapéuticos anti-IFN alfa

5 A. Antecedentes

Se usó el perfilado de expresión génica para identificar genes farmacodinámicos (PD) cuyos transcritos satisfacen tres criterios de selección. Específicamente, son 1) inducibles por subtipos de IFN de tipo 1, 2) están reprimidos en el suero de pacientes con LES por MEDI-545 y 3) están sobreexpresados en pacientes con LES en comparación con donantes sanos normales. Dichos genes incluyen los presentados en la Solicitud Internacional n.º PCT/US2007/024947, presentada el 6 de diciembre de 2007, en la Solicitud Internacional n.º PCT/US2008/062646, presentada el 5 de mayo de 2008, en la Solicitud Internacional n.º PCT/US2009/033407, presentada el 6 de febrero de 2009 (que se refiere a perfiles de marcadores de miARN y perfiles de marcadores PD inducidos por IFN de tipo 1 o IFN α en enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias) y en la Solicitud Internacional n.º PCT/US2009/048028, presentada el 19 de junio de 2009.

Los estudios previos permitieron la identificación de grupos de genes que pueden usarse como “firmas” de enfermedades, tales como LES. Por ejemplo, previamente se identificó una firma de 21 genes para LES y otras enfermedades autoinmunitarias. Véase la Solicitud Internacional n.º PCT/US2007/024947, presentada el 6 de diciembre de 2007. Se quiso determinar si podría usarse de manera fiable un subconjunto de los 21 genes para identificar pacientes que padezcan enfermedades autoinmunitarias, tales como LES. Además, se quiso determinar si podría usarse un subconjunto de los 21 genes como firma para determinar si un paciente respondería a un agente terapéutico que modula el interferón de tipo 1, tal como, por ejemplo, anticuerpos anti-interferón alfa o anticuerpos anti-receptor de interferón.

Para determinar si podría usarse un subconjunto de los 21 genes para identificar pacientes, se analizaron datos de expresión génica de pacientes implicados en ensayos clínicos en curso de MEDI-545. Se administró MEDI-545 a pacientes con LES siguiendo protocolos clínicos convencionales. El resultado clínico se evaluó usando métodos de evaluación de LES convencionales tales como los índices Safety of Estrogens in Lupus Erythematosus-Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SELENA-SLEDAI), the British Isles Lupus Activity Group y el Physician Global Assessment (MDGA). El perfilado de expresión génica de las muestras de los pacientes se realizó usando genoma humano de Affymetrix U133 más 2.0 GeneChips® para identificar genes candidatos.

Como se analiza más adelante, este análisis condujo a la identificación de un conjunto de genes de diagnóstico (por ejemplo, un ensayo basado en 4 o 5 genes) para la identificación de pacientes (por ejemplo, pacientes con LES o miositis) para su tratamiento con un agente terapéutico anti-IFN alfa o anti interferón de tipo I. Específicamente, se seleccionó el conjunto de genes de diagnóstico por su capacidad para predecir la respuesta a sifalimumab (MEDI-545) en pacientes con LES. Como resultado, la medición de la expresión de estos cuatro genes puede usarse para predecir pacientes con LES que se beneficiarán o no del tratamiento con sifalimumab. Como se detalla más adelante, puede usarse la expresión de los cuatro genes en una diversidad de situaciones y para identificar pacientes adecuados para el tratamiento con terapias dirigidas contra esas enfermedades. Un grupo de cinco genes adecuados para el ensayo de diagnóstico consiste en IFI44, IFI44L, IFI27, RSAD2 e IFI6. Pueden ser adecuados 4 genes cualesquiera seleccionados de este grupo para un ensayo de diagnóstico. El grupo de genes para el que se proporcionan los datos analíticos en la Tabla 1 y en las Figuras 1 y 2 consisten en IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2.

45 B. Principio del Ensayo

El ensayo de diagnóstico se basa en la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa Cuantitativa (qRT-PCR). Este ensayo amplifica y detecta transcritos que proceden de cuatro genes diana: IFI44, IFI44L, IFI27 y RSAD2. El ensayo de diagnóstico también amplifica y detecta un conjunto de moléculas de ARN endógenas como controles (“genes constitutivos”): ACTB, GAPDH y ARNr 18S. Los genes transcritos se amplifican a partir de muestras de ARN total obtenidas de muestras de sangre entera recogidas de pacientes usando el sistema de ARN en sangre PAXgene™ aclarado (Qiagen, n.º de Cat. del kit 762164; Becton Dickinson, tubos de recogida n.º de Cat. 762165; K042613). El ARN se aísla usando los procedimientos especificados en el kit de ARN en sangre PAXgene™. Los transcritos diana se amplifican usando dos cebadores directo e inverso específicos de la secuencia (no marcados). Cada diana amplificada se detecta usando una sonda específica de secuencia que se marca con un resto indicador fluorescente, FAM, y un resto de inactivador de la fluorescencia, BHQ1. Cada diana se amplifica y se detecta en pocillos individuales de una placa de 96 pocillos. Se realiza una determinación cuantitativa de la cantidad de cada transcrito en una muestra basándose en la detección de fluorescencia en el instrumento de PCR en Tiempo Real 7500 Fast Dx de Applied Biosystems, un sistema de ensayo clínico múltiplex (Applied Biosystems, Foster City, CA, n.º de Cat. 4406985; K082562) con la versión de software SDS 1.4.

La medición cuantitativa da como resultado la determinación de un valor de ciclo umbral (Ct) para cada diana que corresponde a la abundancia relativa del transcrito en la muestra de ARN. El Ct se determina midiendo el aumento geométrico en la señal de fluorescencia que resulta de la liberación de la proximidad del indicador-inactivador por la actividad exonucleasa 5'-3' de la polimerasa durante la fase de elongación de cada ciclo de amplificación. Los

valores Ct cuantitativos para cada gen y control se usan para calcular el nivel de sobreexpresión de genes diana en sujetos que padecen enfermedades autoinmunitarias con respecto a sujetos sanos. El nivel de sobreexpresión puede expresarse como un cambio medio en veces en el nivel de ARNm de los genes diana en un sujeto que padece una enfermedad autoinmunitaria con respecto al nivel medio de los genes en un sujeto sano o puede expresarse como una puntuación de la sobreexpresión de los genes inducibles por Interferón de Tipo I.

Específicamente, la puntuación (ΔCt_{IFN}) ("delta Ct") se calcula como la diferencia entre el valor medio de Ct para los cuatro genes diana y el valor medio de Ct de los tres genes de control de acuerdo con el siguiente algoritmo.

$$\Delta Ct_{IFN} = \frac{(Ct_{IFI44} - Ct_{REF}) + (Ct_{IFI44L} - Ct_{REF}) + (Ct_{IFI27} - Ct_{REF}) + (Ct_{RSAD2} - Ct_{REF})}{4};$$

donde

$$\Delta Ct_{REF} = \frac{Ct_{ACTB} + Ct_{GAPDH} + Ct_{18S}}{3}$$

Después se usa esta puntuación para determinar un resultado de ensayo cualitativo en el que una puntuación mayor o igual a un límite es un resultado de ensayo positivo y una puntuación menor que un límite es un resultado de ensayo negativo. Un resultado negativo indica que no es probable que un paciente responda al tratamiento con sifalimumab (No Respondedor) y un resultado positivo indica que es probable que un paciente responda al tratamiento con sifalimumab (Respondedor).

C. Etapas de ensayo

1. Preparación del ARN

Se prepara ARN total a partir de sangre entera, usando el Sistema de ARN en sangre PAXgene™ aclarado (Qiagen, n.º de Cat. del kit 762164, Becton Dickinson, tubos de recogida n.º de Cat. 762165; K042613) y proporciona el molde para la síntesis de ADNc. Se ensayan el rendimiento y la calidad del ARN por espectrofotometría midiendo la absorbancia a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm. El rendimiento de ARN se calcula usando la fórmula C (mg/ml) = $A_{280}/0,025$. Además, se evalúa la pureza del ARN usando la relación de la absorbancia a 260 nm y a 280 nm. El intervalo aceptable de la relación A_{260}/A_{280} es $\geq 1,6$.

2. Síntesis de ADNc y amplificación de la diana

Se sintetiza ADNc a partir de ARN total purificado usando la Mezcla de Enzima RT líquida y el Tampón RT que contiene los cebadores de RT y nucleótidos. La síntesis de ADNc usa una estrategia de cebado aleatorio usando cebadores de RT que son una mezcla de hexadecámeros aleatorios que hibridan con las moléculas de ARN y sirven como sustrato para las Enzimas RT. El ADNc resultante contiene una mezcla proporcional de ADN que representa las secuencias presentes en la muestra de ARN.

Los transcritos diana se amplifican y detectan simultáneamente usando el tampón de qPCR, el cebador y sondas de genes y polimerasa AmpliTaq Gold de calidad clínica. Durante cada ciclo de amplificación, dos cebadores directo e inverso específicos de secuencia (no marcados) hibridan con moldes de ADNc complementarios durante la fase de hibridación y sirven como sustrato para la polimerasa AmpliTaq Gold durante la fase de alargamiento, dando como resultado la producción de una nueva cadena de ADN complementaria a la diana. Cada uno de los cebadores directo e inverso hibridan con una cadena con sentido o antisentido diferente. La detección de cada diana amplificada se realiza usando una sonda específica de secuencia que está marcada con un resto indicador fluorescente, FAM, y un resto inactivador de la fluorescencia, BHQ1, que hibrida con la secuencia diana complementaria durante la fase de hibridación. Cada diana se amplifica y detecta en pocillos individuales de una placa de 96 pocillos.

Protocolo de ciclos Térmicos	
37 °C durante 15 min	
95 °C durante 10 min	
95 °C durante 15 s	50 ciclos
60 °C durante 1 min	

Protocolo de ciclos Térmicos
modo de ensayo del aparato de ciclos térmicos 7500: estándar

3. Detección de la señal

5 Se realiza una determinación cuantitativa de la cantidad de cada transcrito en una muestra basándose en la detección de fluorescencia en el instrumento de PCR de Tiempo Real 7500 Fast Dx de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA, n.º de Cat. 4406985; K082562) con la versión de software SDS 1.4, lo cual da como resultado la determinación de un valor de ciclo umbral (Ct) para cada diana que corresponde a la abundancia relativa del transcrito en la muestra de ARN. El instrumento determina el Ct midiendo el aumento geométrico en la
10 señal de fluorescencia que resulta de la liberación de proximidad de indicador-inactivador por la actividad exonucleasa 5'-3' de la polimerasa durante la fase de alargamiento de cada ciclo de amplificación. Los valores Ct cuantitativos para cada gen y control se usan para calcular una puntuación de sobreexpresión de los genes inducibles por Interferón de Tipo I.

15 4. Controles de ensayo

Los controles de ARN de transcrito *in vitro* (IVT) (cada uno de los cuatro genes diana y los controles del gen constitutivos) opcionalmente incluidos con cada ensayo están diseñados para detectar posibles errores del usuario, contaminación, reacciones cruzadas y/o fallos del ensayo durante las etapas de transcripción inversa, síntesis de
20 ADNc, PCR, hibridación y/o detección. Los resultados del control se usan como controles de validez para validar o invalidar un ensayo dado. No se usan para validar el aislamiento de ARN, que se realiza con el Sistema de ARN de sangre PAXgene™ aclarado y se controlan mediante una comprobación de la calidad del ARN. Puede incluirse un control negativo y un control bajo positivo, próximo al límite.

25 5. Software

Se usa un software para calcular el delta Ct usando la ecuación descrita anteriormente. Después, se usa el delta Ct para determinar un resultado de ensayo cualitativo en el que una puntuación mayor o igual a un límite es un resultado de ensayo positivo y una puntuación menor que el límite es un resultado de ensayo negativo. Un resultado
30 negativo indica que no es probable que un paciente responda al tratamiento con sifalimumab (No Respondedor) y un resultado positivo indica que es probable que un paciente responda al tratamiento con sifalimumab (Respondedor).

6. Componentes del kit de ensayo

Uso	Componentes
Reactivos de RT	Tampón de RT
	Mezcla de enzima RT
	Diluyente
Reactivos de Amplificación de ADN	Tampón de qPCR
	Cebadores oligonucleotídicos y sondas para IFI44, IFI44L, IFI27 RSAD2 y cebadores oligonucleotídicos y sondas para Tres Genes de Control Genes (18S, ACTB y GAPDH)
	Polimerasa AmpliTaq Gold
Controles	Control Positivo
	Control Negativo
	NTC

35 7. Oligonucleótidos para amplificar y detectar simultáneamente genes diana

Nombre del Oligo	Diana	SEQ ID NO:	Secuencia
MEDI_0001-F	18S	SEQ ID NO: 1	GCTACCACATCCAAGGAAGG
MEDI_0001-P		SEQ ID NO: 2	CGCAAATTACCCACTCCCGAC CC
MEDI_0001-R		SEQ ID NO: 3	GCCTCGAAAGAGTCCTGTATT

ES 2 613 055 T3

Nombre del Oligo	Diana	SEQ ID NO:	Secuencia
MEDI_0002-F	ACTB	SEQ ID NO: 4	ACAGAGCCTCGCCTTTG
MEDI_0002-P		SEQ ID NO: 5	AGCTGGCGGCGGGTGTGG
MEDI_0002-R		SEQ ID NO: 6	CCTTGCACATGCCGGAG
MEDI_0003_A-F	GAPDH	SEQ ID NO: 7	ACATCGCTCAGACACCATG
MEDI_0003_A-P		SEQ ID NO: 8	CCGTTGACTCCGACCTTCACC TT
MEDI_0003_A-R		SEQ ID NO: 9	ACCAGAGTTAAAAGCAGCCC
MEDI_0003_B-F	GAPDH	SEQ ID NO: 10	TGGGTGTGAACCATGAGAAG TATG
MEDI 0003 B-P		SEQ ID NO: 11	CCTCAAGATCATCAGCAATGC CTCCTGCA
MEDI 0003 B-R		SEQ ID NO: 12	CAGGGGTGCTAAGCAGTTGG
MEDI_0004-F	IFI27	SEQ ID NO: 13	CTCTCACCTCATCAGCAGTG
MEDI_0004-P		SEQ ID NO: 14	CCAGAGGCCACCCTGACCAC
MEDI_0004-R		SEQ ID NO: 15	TCACAACCTGTAGCAATCCTGG
MEDI_0005-F	IFI44	SEQ ID NO: 16	GATGCGAAGATTCACTGGATG
MEDI_0005-P		SEQ ID NO: 17	AGTTCTCAAGGCAGACAGTA AGCTCTTC
MEDI_0005-R		SEQ ID NO: 18	TGTTGAACCAGGGATCCATAT
MEDI_0006-F	IFI44L	SEQ ID NO: 19	AAGCCGTAGTGGGGTCT
MEDI_0006-P		SEQ ID NO: 20	TATACCGCTCGGTTATGCTGG TG
MEDI-0006-R		SEQ ID NO: 21	AACATAAATGGCAGAGATTTT CCA
MEDI_0007-F	RSAD2	SEQ ID NO: 22	AAAGACTCCTACCTTATTCTG GATG
MEDI_0007-P		SEQ ID NO: 23	CTGAACTGTAGAAAGGGACG GAAGGAC
MEDI_0007-R		SEQ ID NO: 24	CTTCTACACCAACATCCAGGA

8. Secuencia de genes diana

Nombre de la Diana	SEQ ID NO
IFI27 variante 1	SEQ ID NO: 25
IFI27 variante 2	SEQ ID NO: 26
IFI44	SEQ ID NO: 27
IFI44L	SEQ ID NO: 28
IFI6 variante 1	SEQ ID NO: 29
IFI6 variante 2	SEQ ID NO: 30
IFI6 variante 3	SEQ ID NO: 31
RSAD2	SEQ ID NO: 32
18S	SEQ ID NO: 33
ACTB	SEQ ID NO: 34
GAPDH	SEQ ID NO: 35

X. Ejemplo 2: una diversidad de análisis demuestra que la respuesta a MEDI-545 se correlaciona con la firma de cuatro genes

El valor umbral usado para designar un sujeto de diagnóstico positivo frente a negativo se determinó usando dos métodos primarios. En primer lugar, se evaluó la distribución de la puntuación del cambio en veces de diagnóstico de cuatro genes de 202 sujetos con LES con respecto a la presencia de modas más allá de una sola moda. Dicha distribución multimoda implicaría la presencia de más de una población de puntuación. A partir de esta distribución, se identificaron dos modas distintas y el centroide de la región que discriminaba esas dos modas se encontró a un valor de aproximadamente 4. La distribución muestra que puede usarse un intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 para discriminar las dos modas y, por lo tanto, un límite de cambio en veces medio adecuado puede estar comprendido entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8.

En segundo lugar, se evaluó la distribución de puntuación de cambio en veces de diagnóstico de 24 genes de 24 donantes sanos normales con respecto a los límites superiores en comparación con la distribución de puntuación de LES. La puntuación de cambio en veces de diagnóstico promedio de los 24 donantes sanos es 1,34 con el límite superior (media +2*SD) de 2,91. Como el recuento de sujetos en la población de donantes sanos normales era mucho menor que el recuento de sujetos en nuestra población de enfermedad, se usó una estimación conservativa de la puntuación de diagnóstico de límite superior en los donantes sanos normales que coincidía con los resultados de la distribución de puntuación LES bimodal. De esta manera, se seleccionó un punto de corte de ≥ 4 para estratificar a los pacientes con LES en grupos positivos para el diagnóstico y negativos para el diagnóstico.

Para la población positiva para el diagnóstico, se estratificaron 147 sujetos con LES en este grupo y la media, mediana y desviación típica para las puntuaciones son 36,13, 63,76 y 2,71, respectivamente. Para la población negativa para el diagnóstico, se estratificaron 55 sujetos con LES en este grupo y la media, mediana y desviación típica para las puntuaciones son 0,95, 0,89 y 2,00, respectivamente. Un ensayo t modificado de Welch bilateral de dos muestras indica una diferencia significativa entre los dos grupos a un valor de p de $1,62 \times 10^{-66}$.

Se generaron curvas de características operativas del receptor (ROC) usando el criterio de valoración clínico SLEDAI usando la firma de cuatro genes (es decir, firma de IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2) obtenida a partir de los datos del ensayo clínico basado en el cálculo del cambio en veces. La curva se muestra en la Figura 1 usando una caída de SLEDAI de al menos 4 puntos desde el punto de referencia como criterio de valoración, evaluado en los días 182, 196 y 210 después del tratamiento. Basándose en la curva ROC, se seleccionó un punto límite de la media de cambio en veces de ≥ 4 en la expresión para IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2.

Con un punto límite de la medida de cambio en veces ≥ 4 , la sensibilidad y especificidad del ensayo es del 87,0 % y del 32,9 %, respectivamente, basándose en los datos obtenidos a partir de muestras de sangre recogidas el día 182 después del tratamiento. El ABC para los datos del día 182 es de 0,59. Con un punto de corte de la medida de cambio en veces ≥ 4 , la sensibilidad y especificidad del ensayo es del 85,7 % y 32,8 %, respectivamente, basándose en los datos obtenidos a partir de muestras de sangre recogidas el día 196 después del tratamiento. El ABC para los datos del día 196 es de 0,57. Finalmente, cuando se usa el mismo punto límite, la sensibilidad, especificidad y valores de ABC obtenidos al día 210 después del tratamiento son del 86,0 %, 33,8 % y 0,56, respectivamente.

Cuando se usa la media de sobreexpresión mostrada como cambio en veces para cada uno de los cuatro genes como clasificador para repartir los pacientes con LES en el estado Positivo al Diagnóstico (Respondedor) frente a Negativo al Diagnóstico (No Respondedor), existe una clara separación entre grupos. La distribución de las puntuaciones medias de los cuatro genes en una escala log2 presenta claramente dos modos aparentes, cayendo pocos valores entre ellos. Las Figuras 2A y B muestran la distribución de pacientes en grupos de ensayo positivos y negativos para el diagnóstico usando el diagnóstico de cuatro genes (IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2) con un límite de la medida de cambio en veces ≥ 4 .

A. SLENA-SLEDAI ≥ 4

Se reunieron todos los grupos de dosificación de sifalimumab a través de MI-CP 152 y usaron el criterio de valoración clínico de reducción en SELENA-SLEDAI ≥ 4 puntos respecto del punto de referencia (Respondedor SELENA-SLEDAI) para calcular en el día 182 un valor predictivo positivo del 46,6 % (PPV; porcentaje de sujetos que responden entre sujetos Positivos para el Diagnóstico [Dx+]). De forma similar, se calculó un valor predictivo negativo en el día 182 del 82,1 % (NPV, porcentaje de sujetos no respondedores entre sujetos Negativos para el Diagnóstico [Dx-]). Para este mismo criterio de valoración clínico, los valores de sensibilidad y especificidad fueron del 87,0 % y del 32,9 %.

Como se observó una tasa de respuesta al placebo de aproximadamente un 20 % a un 40 %, se consideró adecuado calcular el "delta PPV" y "delta NPV" para calcular un factor en el efecto del placebo sobre las tasas de precisión. El valor delta PPV es la diferencia entre el PPV para los sujetos tratados con sifalimumab (basándose principalmente en los datos de 0,3 y 1,0 mg/kg disponibles en el momento del análisis intermedio) y el PPV para los sujetos tratados con placebo. De forma similar, para el delta NPV, este cálculo consistía en la diferencia entre el NPV para los sujetos tratados con sifalimumab (de nuevo, principalmente los datos de los grupos de 0,3 y 1,0 mg/kg)

5 y el NPV para los sujetos tratados con placebo. Estos parámetros estadísticos delta PPV/NPV son estimaciones conservativas del PPV y NPV y demuestran el porcentaje de pacientes que responden habiendo recibido un fármaco, en el contexto de los pacientes que responden habiendo recibido placebo. De esta manera, estos parámetros estadísticos muestran el nivel de "interferencias" intrínseco en el estado respondedor. Sin embargo, incluso con estos valores de PPV/NPV ajustados, aún se observa una fuerte tasa de respuesta para los pacientes positivos a Dx tratados con Sifalimumab en comparación a los pacientes negativos a Dx tratados con Sifalimumab.

En la Tabla 1 se muestra un resumen de los resultados

10

Tabla 1. Tasas de respuesta estratificadas por estado de diagnóstico, notificado en los días 182, 196 y 210 después del tratamiento

Grupo de Tratamiento	SELENA-SLEDAI									
	Estado DX	Respondedores en el día 182	IC 95 % Día 182	Respondedores en el día 196	IC 95 % Día 196	Respondedores en el día 210	IC 95 % Día 210			
Sifalimumab	Positivo	46,6 % (88)	36,5 %-56,9 %	48,9 % (88)	38,7 %-59,1 %	50,6 % (87)	40,3 %-60,8 %			
	Negativo	17,9 % (28)	7,9 %-35,6 %	21,4 % (28)	10,2 %-39,5 %	21,4 % (28)	10,2 %-39,5 %			
Placebo	Positivo	32,1 % (28)	17,9 %-50,7 %	39,3 % (28)	23,6 %-57,6 %	37,0 % (27)	21,5 %-55,8 %			
	Negativo	11,1 % (9)	2,0 %-43,5 %	22,2 % (19)	6,3 %-54,7 %	11,1 % (9)	2,0 %-43,5 %			
Sifalimumab-Placebo	Positivo	14,4 %	-5,7 %-34,6 %	9,6 %	11,3 %-30,5 %	13,5 %	-7,5 %-34,6 %			
	Negativo	6,7 %	-36 %-34,8 %	-0,8 %	31,9 %-30,3 %	10,3 %	15,2 %-35,9 %			

IC = intervalo de confianza; DX = diagnóstico

Las Figuras 3A y B muestran datos de un estudio de aumento de la dosis, controlado con placebo, con doble enmascaramiento, aleatorio, multicéntrico de fase 1b, para evaluar múltiples dosis intravenosas de MEDI-545 en pacientes con LES de moderado a gravemente activo. Todos los sujetos con LES tienen una puntuación SLEDAI ≥ 6 antes de la selección. Las Figuras 3A y B muestran el área bajo la curva con ajuste de tiempo menos la puntuación inicial SLEDAI en pacientes con LES positivos o negativos para la firma de cuatro genes (IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2) en cohortes de placebo o de 0,3/1/3/10 mg/kg de MEDI-545. Figura 3A positivo para la firma, Figura 3B negativo para la firma.

No hay patrones de correlación importantes entre el diagnóstico de cuatro genes (es decir la firma de IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2) y las variables demográficas/clínicas primarias de los sujetos en los ensayos clínicos. En la Tabla 2 se proporcionan coeficientes de correlación de Pearson para estas variables primarias.

Tabla 2. Coeficientes de correlación de Pearson para la firma de cuatro genes (es decir, la firma de IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2) y las variables demográficas/clínicas primarias. El día 182 y el día 196 representan patrones de expresión de genes obtenidos a partir de sangre recogida el día 182 y 196, respectivamente, después de la administración de MEDI545.

VARIABLES DEMOGRÁFICAS/CLÍNICAS	DÍA 182	DÍA 196
Edad	-0,04	-0,04
Peso	0,11	0,07
Sexo	0,11	0,10
Raza	-0,09	-0,09
Etnia	-0,14	-0,14
País	-0,11	-0,11
Uso de esteroides inicial	0,17	0,13

B. Correlación positiva en respuestas a SELDAI, reducción (mejoría) ≥ 4 puntos.

Los datos proceden del ensayo CP152. Se estratificaron sujetos con LES de moderada a gravemente activo mediante la selección de la firma de IFN de tipo I y después se expusieron a placebo o sifalimumab los días 0-182. Se muestra una respuesta SLEDAI, que es una reducción SLEDAI (mejoría en la actividad de la enfermedad) ≥ 4 puntos. Los cuadrados rellenos/líneas continuas representan sujetos expuestos a sifalimumab y los cuadrados blancos/líneas discontinuas representan pacientes con placebo. Las líneas cortas en los días 182-210 solo son valores medios para los días 182-210, la línea continua sin símbolos representa el valor medio para sujetos con sifalimumab y las líneas discontinuas sin símbolos representan valores medios para sujetos con placebo. Se incluyen sujetos que recibieron al menos una dosis de placebo o sifalimumab y que tuvieron una puntuación SLEDAI basal inicial ≥ 6 , mostrándose los datos para los sujetos que recibieron 1, 3 o 10 mg/kg de sifalimumab o placebo. Los sujetos que requirieron corticosteroides de rescate a niveles mayores que los permitidos en el protocolo para un aumento en la actividad de la enfermedad en o antes del día 196, se consideran no respondedores en este análisis.

La Figura 4A incluye sujetos con un ensayo de diagnóstico positivo en la selección, con un promedio de respuesta SLEDAI (%) en los días 182-210 del 52,5 % para sujetos con sifalimumab (n = 88) y del 33,9 % para sujetos con placebo (n = 22). La Figura 4B incluye sujetos con un ensayo de diagnóstico negativo en la selección, con una respuesta compuesta promedio en los días 182-210 del 25,7 % para los sujetos con sifalimumab (n = 22) y del 22,2 % para los sujetos con placebo (n = 6).

C. Correlación positiva en la reducción de la respuesta a la firma y SLEDAI. Respuestas de SLEDAI, reducción (mejoría) ≥ 4 puntos, en sujetos Dx+ con ≥ 50 % reducción frente a <50 % reducción después del punto de referencia Dx.

Figuras 5A y B. Los datos proceden del ensayo CP152. Se estratificaron sujetos con LES de moderada a gravemente activa según la firma de IFN de tipo I en la selección y después se expusieron a placebo o sifalimumab en los días 0-182. Se muestra una respuesta SLEDAI, que es una reducción SLEDAI (mejoría en la actividad de la enfermedad) ≥ 4 puntos. Los cuadrados negros/línea continua representan sujetos expuestos a sifalimumab y los cuadrados blancos/líneas discontinuas representan pacientes con placebo. Las líneas cortas en los días 182-210 solo son valores promedio para los días 182-210, la línea continua sin símbolos representa el valor medio para los sujetos con sifalimumab y las líneas discontinuas sin símbolos representan los valores medios para los sujetos con placebo. Se incluyen sujetos que recibieron al menos una dosis de placebo o sifalimumab y una puntuación inicial SLEDAI > 6 , mostrándose los datos para los sujetos que recibieron 1, 3 o 10 mg/kg de sifalimumab o placebo. Los sujetos que requirieron corticosteroides de rescate a niveles mayores que los permitidos en el protocolo para un aumento en la actividad de la enfermedad en o antes del día 196, se consideran no respondedores en este análisis.

La Figura 5A incluye sujetos con un ensayo de diagnóstico positivo en la selección y, si se tratan con sifalimumab, tenían una mediana de la reducción $> 50\%$ en la puntuación de la firma de diagnóstico en el punto de referencia después de los días de dosificación 28-210, con una respuesta promedio SLEDAI (%) en los días 182-210 del 66,3 % para los sujetos con sifalimumab (n = 23) y del 33,9 % para los sujetos con placebo (n = 22). La Figura B

5 incluye sujetos con un ensayo de diagnóstico positivo en la selección y, si se tratan con sifalimumab, tenían una mediana de la reducción $< 50\%$ en la puntuación de la firma de diagnóstico en el punto de referencia después de los días de dosificación 28-210, con una respuesta SLEDAI promedio en los días 182-210 del 48,0 % para los sujetos con sifalimumab (n = 23) y del 33,9 % para los sujetos con placebo (n = 22).

10 D. Correlación positiva en respuesta compuesta y firma

Como se muestra en las Figuras 6A y B, la respuesta compuesta de los sujetos se correlaciona con una puntuación de firma de cuatro genes positiva. Los datos proceden del ensayo CP 152. Se estratificaron sujetos con LES de moderada a gravemente activo por la firma de IFN de tipo I en la selección y después se expusieron a placebo o sifalimumab a dosis de 0,3, 1, 3 o 10 mg/kg IV cada dos semanas, en los días 0-182. Se muestra una respuesta compuesta, que es una reducción SLEDAI (mejoría) ≥ 4 puntos + no más de 1 nueva puntuación BILAG B (una medida de un brote al menos moderado) + ausencia de empeoramiento en la evaluación física global $> 0,76$ centímetros (0,3 pulgadas) en una escala visual análoga de 7,62 centímetros (3 pulgadas). Los cuadrados negros/línea continua representan sujetos expuestos a sifalimumab y los cuadrados blancos/líneas discontinuas representan pacientes con placebo. Las líneas cortas en los días 182-210 solo son los valores promedio para los días 182-210, representando la línea continua sin símbolos el valor promedio para los sujetos con sifalimumab y representando las líneas discontinuas sin símbolos los valores medios para los sujetos con placebo. Se incluyen sujetos que recibieron al menos una dosis de placebo o sifalimumab y que tuvieron una puntuación SLEDAI en el punto de referencia ≥ 6 . Los sujetos que requirieron corticosteroides de rescate a niveles mayores que los permitidos en el protocolo para un aumento en la actividad de la enfermedad en o antes del día 196 se consideran no respondedores en este análisis. La Figura 6A incluye sujetos con un ensayo de diagnóstico positivo en la selección, con respuesta compuesta promedio (%) en los días 182-210 del 46,4 % para los sujetos con sifalimumab (n = 88) y del 36,1 % para los sujetos con placebo (n = 29). La Figura 6B incluye sujetos con un ensayo de diagnóstico negativo en la selección, con una respuesta compuesta promedio los días 182-210 del 19,1 % para los sujetos con sifalimumab (n = 28) y del 14,8 % para los sujetos con placebo (n = 9).

E. Correlación positiva en área bajo la curva SLEDAI menos el punto de referencia

Como se muestra en las Figuras 7A y B, la reducción en el área bajo la curva SLEDAI menos el punto de referencia se correlaciona con una puntuación de firma de cuatro genes positiva. Los datos proceden del ensayo CP152. Se estratificaron sujetos con LES de moderada a gravemente activo por firma de IFN de tipo I basal y después se expusieron a placebo o sifalimumab a dosis de 0,3, 1, 3 o 10 mg/kg IV cada dos semanas, en los días 0-182. Se muestra el área bajo la curva menos el punto de referencia para la puntuación SLEDAI (una medida de la actividad de la enfermedad), indicando los valores negativos mayores una mayor reducción en la actividad de la enfermedad. Los cuadrados negros/línea continua representan sujetos expuestos a sifalimumab y los cuadrados blancos/líneas discontinuas representan pacientes tratados con placebo. Las líneas cortas en los días 182-210 solo son valores promedio para los días 182-210, representando la línea continua sin símbolos el valor promedio para los sujetos con sifalimumab y representando las líneas discontinuas sin símbolos valores medios para los sujetos tratados con placebo. Se incluyen sujetos que recibieron al menos una dosis de placebo o sifalimumab. La Figura 7A incluye sujetos con un ensayo de diagnóstico positivo en la selección, con un área bajo la curva SLEDAI promedio menos el punto de referencia en los días 182-210 de -2,34 para sujetos con sifalimumab (n = 92) y de -1,14 para sujetos con placebo (n = 30). La Figura 7B incluye sujetos con un ensayo de diagnóstico negativo en la selección, con un área bajo la curva SLEDAI promedio menos el punto de referencia en los días 182-210 de -0,46 para los sujetos con sifalimumab (n = 29) y de -0,88 para los sujetos con placebo (n = 10).

F. Correlación positiva en el cambio SLEDAI desde el punto de referencia y firma

Como se muestra en las Figuras 8A y B, la reducción en SLEDAI desde el punto de referencia se correlacionaba con una puntuación de firma de cuatro genes positiva. Los datos proceden del ensayo CP152. Se estratificaron sujetos con LES de moderada a gravemente activo por firma de IFN de tipo I en la selección y después se expusieron a placebo o sifalimumab a dosis de 0,3, 1, 3 o 10 mg/kg IV cada dos semanas, desde los días 0-182. Se muestra una respuesta SLEDAI, que es una reducción SLEDAI (mejoría en la actividad de la enfermedad) ≥ 4 puntos, en sujetos con SLEDAI ≥ 6 en el punto de referencia. Los cuadrados negros/línea continua representan sujetos expuestos a sifalimumab y los cuadrados blancos/líneas discontinuas representan pacientes con placebo. Las líneas cortas en los días 168-210 solo son valores promedio para los días 168-210, representando la línea continua sin símbolos el valor medio para sujetos con sifalimumab y representando las líneas discontinuas sin símbolos los valores promedio para los sujetos con placebo. Sujetos que recibieron al menos una dosis de placebo o sifalimumab. Los sujetos que requirieron corticosteroides de rescate a niveles mayores que los permitidos en el protocolo para un aumento en la actividad de la enfermedad en o antes del día 196 se consideran no respondedores en este análisis. Se muestran sujetos con un ensayo de diagnóstico positivo en el punto de referencia y con una reducción mediana en la firma de IFN de tipo I $\geq 50\%$ después de la dosificación de los días 28-210. La Figura 8A incluye sujetos que recibieron

sifalimumab a 1 mg/kg IV con una respuesta promedio SLEDAI en los días 168-210 del 53 % para los sujetos con sifalimumab (n = 10) y del 21 % para los sujetos con placebo de la misma cohorte (n = 7). La Figura 8B incluye sujetos que recibieron sifalimumab a 3 mg/kg IV con respuesta SLEDAI promedio los días 168-210 del 63 % para sujetos con sifalimumab (n = 6) y del 33 % para sujetos con placebo de la misma cohorte (n = 6).

5

G. Inhibición de la firma, respuesta SLEDAI y dosis

Figuras 9 A-C. Los datos proceden del ensayo CP152. Se estratificaron sujetos con LES de moderada a gravemente activo por firma de IFN de tipo I en la selección y después se expusieron a placebo o sifalimumab a dosis de 0,3, 1, 3 o 10 mg/kg IV cada dos semanas, en los días 0-182. Se muestra una respuesta SLEDAI, que es una reducción SLEDAI (mejoría en la actividad de la enfermedad) ≥ 4 puntos, en sujetos con SLEDAI ≥ 6 en el punto de referencia. Los cuadrados negros/línea continua representan sujetos expuestos a sifalimumab y los cuadrados blancos/líneas discontinuas representan pacientes con placebo. Las líneas cortas en los días 168-210 solo son valores promedio para los días 168-210, representando la línea continua sin símbolos el valor medio para los sujetos con sifalimumab y representando las líneas discontinuas sin símbolos los valores promedio para los sujetos con placebo. Sujetos que recibieron al menos una dosis de placebo o sifalimumab. Los sujetos que requirieron corticosteroides de rescate a niveles mayores que los permitidos en el protocolo para un aumento en la actividad de la enfermedad en o antes del día 196 se consideran no respondedores en este análisis. Se muestran los sujetos con un ensayo de diagnóstico positivo en el punto de referencia y con una reducción mediana en la firma de IFN de tipo I ≥ 50 % después de la dosificación de los días 28-210. La Figura 9A incluye sujetos que recibieron sifalimumab a 1 mg/kg IV con una respuesta SLEDAI promedio en los días 168-210 del 53 % para los sujetos con sifalimumab (n = 10) y del 21 % para los sujetos con placebo de la misma cohorte (n = 7). La Figura 9B incluye sujetos que recibieron sifalimumab a 3 mg/kg IV con respuesta SLEDAI promedio en los días 168-210 del 63 % para sujetos con sifalimumab (n = 6) y del 33 % para sujetos con placebo de la misma cohorte (n = 6). La Figura 9C incluye sujetos que recibieron sifalimumab a 10 mg/kg IV con una respuesta SLEDAI promedio en los días 168-210 del 75 % para sujetos con sifalimumab (n = 9) y del 45 % para sujetos con placebo de la misma cohorte (n = 9).

Los datos proceden del ensayo CP152. Se estratificaron sujetos con LES de moderada a gravemente activo por firma de IFN de tipo I en la selección y después se expusieron a placebo o sifalimumab a dosis de 0,3, 1, 3 o 10 mg/kg IV cada dos semanas, en los días 0-182. Se muestra una respuesta SLEDAI, que es una reducción SLEDAI (mejoría en la actividad de la enfermedad) ≥ 4 puntos, en sujetos con SLEDAI basal ≥ 6 . Los cuadrados negros/línea continua representan sujetos expuestos a sifalimumab y los cuadrados blancos/líneas discontinuas representan pacientes con placebo. Las líneas cortas en los días 168-210 solo son valores promedio para los días 168-210, representando la línea continua sin símbolos el valor medio para sujetos con sifalimumab y representando las líneas discontinuas sin símbolos valores promedio para sujetos con placebo. Sujetos que recibieron al menos una dosis de placebo o sifalimumab. Los sujetos que requirieron corticosteroides de rescate a niveles mayores que los permitidos en el protocolo para un aumento en la actividad de la enfermedad en o antes del día 196 se consideran no respondedores en este análisis. Se muestran los sujetos con un ensayo de diagnóstico positivo en el punto de referencia y con una reducción mediana en la firma de IFN de tipo I < 50 % después de la dosificación de los días 28-210. La Figura 10A incluye sujetos que recibieron sifalimumab a 1 mg/kg IV con una respuesta SLEDAI promedio en los días 168-210 del 37 % para sujetos con sifalimumab (n = 10) y del 21 % para sujetos con placebo de la misma cohorte (n = 7). La Figura 10B incluye sujetos que recibieron sifalimumab a 3 mg/kg IV con una respuesta SLEDAI promedio en los días 168-210 del 42 % para sujetos con sifalimumab (n = 12) y del 33 % para sujetos con placebo de la misma cohorte (n = 6). La Figura 10C incluye sujetos que recibieron sifalimumab a 10 mg/kg IV con una respuesta SLEDAI promedio en los días 168-210 del 45 % para sujetos con sifalimumab (n = 15) y del 45 % para sujetos con placebo de la misma cohorte (n = 9).

H. Delta Ct con respecto al cambio en veces con respecto a donantes sanos

En los estudios iniciales, se calcularon los cambios en veces usando un grupo de 24 donantes sanos normales como referencia para cada paciente con LES. Sin embargo, se ha descubierto que esta referencia puede tener algunos problemas de confusión, específicamente: 1) podría introducir variación en el ensayo y 2) la fabricación de una referencia artificial con el mismo intervalo dinámico de forma consistente es problemática.

Se realizaron análisis para evaluar la necesidad de esta referencia normal y se descubrió que cuando se comparaban valores de delta Ct con valores de cambio en veces, existe una correlación mayor del 99 % entre los dos (ambos transformados en log2). Por lo tanto, es posible usar el valor delta Ct con los genes constitutivos de las muestras de los pacientes con LES como referencia, y no existe la necesidad de medir o comparar con donantes sanos. Este enfoque puede mejorarse cuando el resultado primario del ensayo de diagnóstico es un resultado cualitativo de positivo o negativo, a diferencia de una puntuación cuantitativa. Nuestros resultados muestran que un límite ≥ 4 en la escala de cambio en veces se traduce en un límite $\geq 7,6$ en la escala de delta Ct.

60

XI. Ejemplo 3. Relación entre actividad de la enfermedad y expresión de genes inducibles por interferón de tipo 1 y por otras citocinas en sangre en dermatomiositis y polimiositis

A. Antecedentes

5 Se sometió sangre periférica de 42 pacientes con DM o PM a perfilado de expresión génica usando el genoma humano de Affymetrix U133 más 2.0 GeneChips® en un estudio inicial para identificar la prevalencia de pacientes que presentaban sobreexpresión periférica de genes inducibles por IFN de tipo 1. Para obtener una perspectiva científica adicional sobre el IFN de tipo 1 como diana terapéutica potencial para DM y PM, después se incluyeron prospectivamente 24 pacientes con DM o PM y se sometieron a seguimiento durante hasta 6 años (media de 1,9 años) mientras recibían un cuidado clínico convencional.

B. Metodología

15 Se evaluaron cursos clínicos que incluían la puntuación MITAX (índice de actividad de Intención de Tratamiento de Miositis) de la actividad de la enfermedad a lo largo de 150 visitas de pacientes. Este índice se basa en 6 sistemas u órganos que usa el médico, para cada órgano o sistema, que trataría con altas dosis de esteroides y/o fármacos inmunosupresores. Se usaron muestras de sangre periférica recogidas en 80 visitas de pacientes para el análisis de micromatriz de la expresión de genes inducidos por citocinas para las rutas de señalización de IFN de tipo 1, TNF- α , IL-1 β , GM-CSF, IL-10 e IL-13.

C. Resultados

25 35 de los 42 (87 %) pacientes de DM y PM tuvieron una sobreexpresión moderada/fuerte de genes inducibles por IFN de tipo 1 en sangre periférica. En el estudio longitudinal durante el transcurso de tratamiento, 21 de los 24 pacientes mostraron sobreexpresión de una firma de genes inducibles por IFN de tipo 1 en sangre periférica. Específicamente, la sobreexpresión de IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2 y de una firma compuesta de 13 genes inducibles por IFN de tipo 1 (IFI27, RSAD2, IFI44L, ISG15, OAS3, HERC5, MX1, ESPT11, IFIT3, IFI44, OAS1, IFIT1 e IFI6) se correlacionaron en gran medida con la actividad de la enfermedad durante el tratamiento. En el caso de 30 pacientes, la sobreexpresión de genes inducibles por IFN de tipo 1 durante el tratamiento precedía a una recaída de la enfermedad en aproximadamente 1 mes. Las firmas de genes inducibles de TNF- α , IL-1 β , GM-CSF, IL-10 e IL-13 también se sobreexpresaban en pacientes DM y PM, pero no se correlacionaron con la actividad de la enfermedad.

35 La determinación como diana del IFN de tipo 1 puede proporcionar efectos clínicos beneficiosos en las poblaciones de pacientes de DM y PM con sobreexpresión de genes inducibles por IFN de tipo 1 en la periferia. La sobreexpresión de genes inducibles por IFN de tipo 1 en sangre periférica merece un estudio adicional para su uso como biomarcador farmacodinámico y predictivo para el desarrollo de una terapia anti-IFN de tipo 1 para estos pacientes. Específicamente, los resultados descritos anteriormente con LES indican que el diagnóstico con cuatro genes permitiría la identificación de pacientes de DM y PM que responderán a la terapia anti-interferón alfa.

40 XII. Ejemplo 4: uso de una firma de cuatro o cinco genes para evaluar la presencia y magnitud de la sobreexpresión de genes inducibles por IFN de tipo 1 en sangre entera de pacientes que padecen LES, DM, PM, SSc y AR

A. Antecedentes

45 Se emprendieron estudios para determinar si hay un efecto común de activación de la ruta de interferón de tipo I (IFN) en sujetos con lupus eritematoso sistémico (LES), dermatomiositis (DM), polimiositis (PM), artritis reumatoide (AR) y esclerodermia sistémica (SSc).

50 Se identificaron transcritos sobreexpresados en sangre entera (SE) de 262 sujetos con LES, 44 con DM, 33 con PM, 38 con SSc y 89 con AR y se comparó la expresión con 24 sujetos sanos usando Affymetrix U133 Plus 2.0 Genechip®. La activación de la ruta de IFN de tipo I en SE se evaluó individualmente para cada sujeto usando la firma de cinco genes de IFN de tipo I (IFI27, IFI44, IFI44L, IFI6 y RSAD2), así como en piel lesionada de 16 sujetos con LES y 22 con SSc, biopsias de músculo de 37 sujetos con DM y 36 con PM, y tejido sinovial de 20 sujetos con AR. También se evaluaron otras firmas de genes de citocinas tales como TNF- α , IL1 β , IL-10, IL-13, IL-17 y GM-CSF para la activación de rutas en la SE de estos sujetos. Además, se realizó una clasificación molecular de sujetos enfermos y sanos con un método de agrupamiento usando perfiles de expresión de transcritos tanto inducibles por IFN de tipo I como no inducibles por IFN de tipo I.

60 Este panel de 5 genes usado para evaluar la activación de la ruta de IFN de tipo I en sujetos se identificó a partir del conjunto de 21 genes inducibles por IFN de tipo I usados para medir la farmacodinámica de un mAb anti-IFN- α en sujetos con DM, PM y LES, como se describe en Yao *et al.*, 2009. Se descubrió que los 5 genes eran los que más se sobreexpresaban entre estos 21 genes en sujetos con LES, DM, PM, SSc, AR y enfermedad de Sjogren en comparación con donantes sanos normales (Tabla 3). Los genes de la Tabla 3 se clasifican en orden descendente para cada bloque de 21 genes (dentro de cada enfermedad individual), para ilustrar la clasificación de los 5 genes entre los 21 genes.

Tabla 3 Expresión de genes en LES, DM, PM, SSc, AR

Sonda	Gen	Símbolo	Valor p	cambio en veces	prevalencia	enfermedad
202411_at	proteína 27 inducible por interferón alfa	IFI27	0	30,065	0,767	LES
204415_at	proteína 6 inducible por interferón alfa	IFI6	0	16,465	0,882	LES
214059_at	Proteína 44 inducida por interferón	IFI44	0	13,855	0,779	LES
213797_at	dominio que contiene radical de S-adenosil metionina 2	RSAD2	0	13,232	0,763	LES
204439_at	similar a proteína 44 inducida por interferón	IFI44L	0	10,532	0,748	LES
219211_at	peptidasa 18 específica de ubiquitina /// similar a peptidasa 18 específica de ubiquitina /// similar a peptidasa 18 específica de ubiquitina /// similar a peptidasa 18 específica de ubiquitina 18	USP18	0	7,271	0,679	LES
44673_at	lectina 1 de tipo Ig que se une a ácido siálico, sialoadhesina	SIGLEC1	0	6,348	0,656	LES
202145_at	complejo 6 de antígeno de linfocitos, locus E	LY6E	0	6,186	0,683	LES
202869_at	2',5'-oligoadenilato sintetasa 1, 40/46 kDa	OAS1	0	6,181	0,729	LES
205569_at	proteína 3 asociada a lisosomas	LAMP3	0	5,189	0,725	LES
218400_at	3'-5'-oligoadenilato sintetasa 3, 100 kDa	OAS3	0	5,053	0,706	LES
219863_at	dominio hect y RLD 5	HERC5	0	4,841	0,729	LES
203153_at	proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 1 /// proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 1	IFIT1	0	4,840	0,729	LES
205483_s_at	modificador de tipo ubiquitina ISG15	ISG15	0	4,633	0,702	LES
227609_at	interacción con estroma epitelial 1 (mama)	EPST11	0	4,519	0,706	LES
202086_at	resistencia a mixovirus (virus de la gripe) 1, proteína p78 inducible por interferón (ratón) /// resistencia a mixovirus (virus de la gripe) 1, proteína p78 inducible por interferón (ratón)	MX1	0	4,142	0,725	LES
204972_at	2'-5'-oligoadenilato sintetasa 2,69/71 kDa	OAS2	0	4,094	0,683	LES

ES 2 613 055 T3

Sonda	Gen	Símbolo	Valor p	cambio en veces	prevalencia	enfermedad
204747_at	proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 3	IFIT3	0	3,992	0,702	LES
219684_at	proteína transportadora de receptor (quimiosensorial) 4	RTP4	0	3,928	0,649	LES
241916_at	Fosfolípido escramblasa 1	PLSCR1	0	3,297	0,687	LES
241812_at	Proteína 6 transactivada por ADN polimerasa	DNAPTP6	0	3,217	0,561	LES
204415_at1	proteína 6 inducible por interferón alfa	IFI6	0	12,253	0,932	DM
214059_at1	Proteína 44 inducida por interferón	IFI44	2,21E-11	9,736	0,750	DM
213797_at1	dominio que contiene radical de S-adenosil metionina 2	RSAD2	5,63E-10	9,423	0,750	DM
202411_at1	proteína 27 inducible por interferón alfa	IFI27	6,86E-06	8,796	0,682	DM
204439_at1	similar a proteína 44 inducida por interferón	IFI44L	3,13E-08	5,800	0,659	DM
202869_at1	2',5'-oligoadenilato sintetasa 1, 40/46 kDa	OAS1	2,91E-08	4,149	0,727	DM
203153_at1	proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 1 /// proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 1	IFIT1	3,68E-06	3,883	0,682	DM
219863_at1	dominio hect y RLD5	HERC5	3,03E-08	3,753	0,614	DM
205569_at1	proteína 3 de membrana asociada con lisosomas	LAMP3	2,11E-06	3,366	0,591	DM
204747_at1	proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 3	IFIT3	3,66E-09	3,263	0,682	DM
218400_at1	2'-5'-oligoadenilato sintetasa 3, 100 kDa	OAS3	4,34E-06	3,191	0,591	DM
227609_at1	interacción con el estroma epitelial 1 (mama)	EPST11	1,86E-06	3,096	0,568	DM
202086_at1	resistencia a mixovirus (virus de la gripe) 1, proteína p78 inducible por interferón (ratón) /// resistencia a mixovirus (virus de la gripe) 1, proteína p78 inducible por interferón (ratón)	MX1	1,60E-06	3,058	0,636	DM

ES 2 613 055 T3

Sonda	Gen	Símbolo	Valor p	cambio en veces	prevalencia	enfermedad
219211_at1	peptidasa 18 específica de ubiquitina /// similar a peptidasa 18 específica de ubiquitina /// similar a peptidasa 18 específica de ubiquitina /// similar a peptidasa 18 específica de ubiquitina	USP18	5,25E-05	3,044	0,568	DM
241916_at1	Fosfolípido escramblasa 1	PLSCR1	3,81E-08	2,939	0,705	DM
44673_at1	lectina 1 de tipo Ig que se une al ácido siálico, sialoadhesina	SIGLEC1	2,87E-07	2,841	0,432	DM
205483_s_at 1	modificador de tipo ubiquitina ISG15	ISG15	6,13E-06	2,722	0,568	DM
202145_at1	Complejo de antígeno 6 de linfocitos, locus E	LY6E	3,07E-05	2,685	0,500	DM
204972-at1	2'-5'-oligoadenilato sintetasa 2, 69/71 kDa	OAS2	1,59E-06	2,545	0,500	DM
219684_at1	proteína 4 del transportador del receptor (quimiosensorial)	RTP4	3,84E-05	2,528	0,568	DM
241812_at1	Proteína 6 transactivada por ADN polimerasa	DNAPTP6	0,001397 833	1,624	0,318	DM
204415_at2	proteína 6 inducible por interferón alfa	IFI6	0	11,500	1,000	PM
213797_at2	dominio que contiene radical de S-adenosil metionina 2	RSAD2	8,53E-08	6,775	0,727	PM
214059_at2	Proteína 44 inducida por interferón	IFI44	4,66E-07	6,283	0,727	PM
202411_at2	proteína 27 inducible por interferón alfa	IFI27	0,000334 1	5,652	0,667	PM
204439_at2	Similar a proteína 44 inducida por interferón	IFI44L	2,87E-06	4,470	0,667	PM
202869_at2	2',5'-oligoadenilato sintetasa 1, 40/46 kDa	OAS1	3,08E-08	4,431	0,697	PM
219863_at2	dominio hect y RLD5	HERC5	1,65E-06	3,102	0,576	PM
203153_at2	proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 1 /// proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 1	IFIT 1	0,000223 959	2,922	0,576	PM
227609_at2	interacción con estroma epitelial 1 (mama)	EPST11	2,60E-06	2,846	0,606	PM
205569_at2	proteína de membrana 3 asociada con lisosomas	LAMP3	6,22E-05	2,831	0,576	PM
241916_at2	Fosfolípido escramblasa 1	PLSCR1	3,24E-07	2,753	0,697	PM

ES 2 613 055 T3

Sonda	Gen	Símbolo	Valor p	cambio en veces	prevalencia	enfermedad
204747_at2	proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 3	IFIT3	2,25E-06	2,684	0,606	PM
218400_at2	2'-5'-oligoadenilato sintetasa 3, 100 kDa	OAS3	0,000152 771	2,644	0,424	PM
44673_at2	lectina 1 de tipo Ig que se une a ácido siálico, sialoadhesina	SIGLEC1	5,34E-05	2,620	0,424	PM
202145_at2	complejo 6 de antígeno de linfocitos, locus E	LY6E	0,000183 714	2,406	0,394	PM
205483_s_at 2	modificador de tipo ubiquitina ISG15	ISG15	9,97E-05	2,369	0,485	PM
202086_at2	resistencia a mixovirus (virus de la gripe) 1, proteína p78 inducible por interferón (ratón) /// resistencia a mixovirus (influenza virus) 1, proteína p78 inducible por interferón (ratón)	MX1	0,000540 479	2,342	0,515	PM
219684_at2	proteína 4 transportadora de receptor (quimiosensorial)	RTP4	8,87E-05	2,218	0,455	PM
219211_at2	peptidasa 18 específica de ubiquitina /// similar a peptidasa 18 específica de ubiquitina /// similar a peptidasa 18 específica de ubiquitina /// similar a peptidasa 18 específica de ubiquitina	USP18	0,003664 023	2,195	0,364	PM
204972_at2	2'-5'-oligoadenilato sintetasa 2. 69/71 kDa	OAS2	0,000106 864	2,082	0,364	PM
241812_at2	Proteína 6 transactivada por ADN polimerasa	DNAPTP6	0,016913 8	1,533	0,242	PM
204415_at3	proteína 6 inducible por interferón alfa	IFI6	0	6,235	0,865	Artritis Reumatoide
214059_at3	Proteína 44 inducida por interferón	IFI44	1,60E-07	3,393	0,596	Artritis Reumatoide
202411_at3	proteína 27 inducible por interferón alfa	IFI27	0,000442781	2,866	0,539	Artritis Reumatoide
213797_at3	dominio que contiene radical de S-adenosil metionina 2	RSAD2	9,28E-06	2,783	0,494	Artritis Reumatoide
202869_at3	2',5'-oligoadenilato sintetasa 1, 40/46 kDa	OAS1	9,98E-08	2,391	0,528	Artritis Reumatoide
204439_at3	similar a proteína 44 inducida por interferón	IFI44L	5,15E-05	2,235	0,461	Artritis Reumatoide
202145_at3	complejo 6 de antígeno de linfocitos, locus E	LY6E	5,88E-12	2,139	0,438	Artritis Reumatoide
241916_at3	Fosfolípido escramblasa 1	PLSCR1	1,66E-06	2,041	0,438	Artritis Reumatoide

ES 2 613 055 T3

Sonda	Gen	Símbolo	Valor p	cambio en veces	prevalencia	enfermedad
44673_at3	lectina 1 de tipo Ig que se une a ácido siálico, sialoadhesina	SIGLEC1	6,83E-08	1,908	0,326	Artritis Reumatoide
227609_at3	interacción con estroma epitelial 1 (mama)	EPST11	6,66E-06	1,825	0,360	Artritis Reumatoide
204972_at3	2'-5'-oligoadenilato sintetasa 2. 69/71 kDa	OAS2	1,23E-09	1,761	0,315	Artritis Reumatoide
202086_at3	resistencia a mixovirus (virus de la gripe) 1, proteína p78 inducible por interferón (ratón) /// resistencia a mixovirus (virus de la gripe) 1, proteína p78 inducible por interferón (ratón)	MX1	0,000342238	1,739	0,371	Artritis Reumatoide
218400_at3	2'-5'-oligoadenilato sintetasa 3, 100 kDa	OAS3	0,000277383	1,739	0,371	Artritis Reumatoide
219863_at3	dominio hect y RLD5	HERC5	0,000175256	1,692	0,303	Artritis Reumatoide
205569_at3	proteína de membrana 3 asociada con lisosomas	LAMP3	0,0029278	1,630	0,303	Artritis Reumatoide
219684_at3	proteína 4 transportadora de receptor (quimiosensorial)	RTP4	0,00252807	1,544	0,281	Artritis Reumatoide
204747_at3	proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 3	IFIT3	0,005459384	1,445	0,348	Artritis Reumatoide
205483_s_at 3	modificador de tipo ubiquitina ISG15	ISG15	0,009827494	1,393	0,292	Artritis Reumatoide
219211_at3	peptidasa 18 específica de ubiquitina /// similar a peptidasa 18 específica de ubiquitina /// similar a peptidasa 18 específica de ubiquitina /// similar a peptidasa 18 específica de ubiquitina	USP18	0,079726231	1,274	0,236	Artritis Reumatoide
241812_at3	Proteína 6 transactivada por ADN polimerasa	DNAPTP6	0,121840941	1,137	0,124	Artritis Reumatoide
203153_at3	proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 1 /// proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 1	IFIT1	0,654268059	1,093	0,270	Artritis Reumatoide
204415_at4	proteína 6 inducible por interferón alfa	IFI6	0	15,488	1,000	Escleroderma
213797_at4	dominio que contiene radical de S-adenosil metionina 2	RSAD2	1,92E-08	5,758	0,711	Escleroderma

ES 2 613 055 T3

Sonda	Gen	Símbolo	Valor p	cambio en veces	prevalencia	enfermedad
214059_at4	Proteína 44 inducida por interferón	IFI44	2,52E-07	4,494	0,658	Escleroderma
202411_at4	proteína 27 inducible por interferón alfa	IFI27	0,001868066	4,096	0,579	Escleroderma
202869_at4	2',5'-oligoadenilato sintetasa 1, 40/46 kDa	OAS1	1,43E-08	3,581	0,711	Escleroderma
204439_at4	similar a proteína 44 inducida por interferón	IFI44L	1,98E-05	3,105	0,553	Escleroderma
203153_at4	proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 1 /// proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 1	IFIT1	2,36E-05	2,919	0,632	Escleroderma
219863_at4	dominio hect y RLD5	HERC5	2,37E-08	2,860	0,632	Escleroderma
202086_at4	resistencia a mixovirus (virus de la gripe) 1, proteína p78 inducible por interferón (ratón) /// resistencia a mixovirus (virus de la gripe) 1, proteína p78 inducible por interferón (ratón)	MX1	9,86E-06	2,308	0,474	Escleroderma
218400_at4	2'-5'-oligoadenilato sintetasa 3, 100 kDa	OAS3	3,26E-05	2,300	0,474	Escleroderma
204747_at4	proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 3	IFIT3	8,63E-07	2,280	0,526	Escleroderma
202145_at4	complejo 6 de antígeno de linfocitos, locus E	LY6E	2,38E-05	2,229	0,421	Escleroderma
205569_at4	proteína de membrana 3 asociada con lisosomas	LAMP3	0,0001192	2,206	0,500	Escleroderma
205483_s_at4	modificador de tipo ubiquitina ISG15	ISG15	1,45E-05	2,177	0,447	Escleroderma
227609_at4	interacción con estroma epitelial 1 (mama)	EPST11	2,54E-05	2,177	0,553	Escleroderma
219684_at4	proteína 4 transportadora de receptor (quimiosensorial)	RTP4	0,000226923	1,943	0,395	Escleroderma
204972_at4	2'-5'-oligoadenilato sintetasa 2, 69/71 kDa	OAS2	3,34E-06	1,909	0,368	Escleroderma
44673_at4	lectina 1 de tipo Ig que se une a ácido siálico, sialoadhesina	SIGLEC1	0,000242727	1,831	0,342	Escleroderma

ES 2 613 055 T3

Sonda	Gen	Símbolo	Valor p	cambio en veces	prevalencia	enfermedad
219211_at4	peptidasa 18 específica de ubiquitina /// similar a peptidasa 18 específica de ubiquitina /// similar a peptidasa 18 específica de ubiquitina /// similar a peptidasa 18 específica de ubiquitina	USP18	0,002152959	1,815	0,316	Escleroderma
241916_at4	Fosfolípido escramblasa 1	PLSCR1	0,000483597	1,793	0,395	Escleroderma
241812_at4	Proteína 6 transactivada por ADN polimerasa	DNAPT6	0,303084481	0,913	0,079	Escleroderma
202411_at	Proteína 27 inducible por interferón alfa	IFI27	0,00094654	25,635	1,000	Síndrome de Sjogren
204439_at	tipo de proteína 44 inducida por interferón	IFI44L	0,008982765	5,742	1,000	Síndrome de Sjogren
219211_at	peptidasa 18 específica de ubiquitina /// similar a peptidasa 18 específica de ubiquitina /// similar a peptidasa 18 específica de ubiquitina /// similar a peptidasa 18 específica de ubiquitina	USP18	0,002566614	5,079	1,000	Síndrome de Sjogren
213797_at	dominio que contiene radical de S-adenosil metionina 2	RSAD2	0,003104168	4,705	1,000	Síndrome de Sjogren
203153_at	proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 1 /// proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 1	IFIT1	0,0104006	4,142	1,000	Síndrome de Sjogren
204747_at	proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 3	IFIT3	0,003638823	3,857	1,000	Síndrome de Sjogren
44673_at	lectina 1 de tipo Ig que se une a ácido siálico, sialoadhesina	SIGLEC1	0,007125541	3,755	1,000	Síndrome de Sjogren
205483_s_at	modificador de tipo ubiquitina ISG15	ISG15	0,000690576	3,557	1,000	Síndrome de Sjogren
219863_at	dominio hect y RLD5	HERC5	0,007639108	3,499	1,000	Síndrome de Sjogren
227609_at	interacción con estroma epitelial 1 (mama)	EPST11	0,001244694	3,060	1,000	Síndrome de Sjogren
204415_at	proteína 6 inducible por interferón alfa	IFI6	0,000905658	2,912	1,000	Síndrome de Sjogren

Sonda	Gen	Símbolo	Valor p	cambio en veces	prevalencia	enfermedad
218400_at	2'-5'-oligoadenilato sintetasa 3, 100 kDa	OAS3	0,009517756	2,764	1,000	Síndrome de Sjogren
202086_at	resistencia a mixovirus (virus de la gripe) 1, proteína p78 inducible por interferón (ratón) /// resistencia a mixovirus (virus de la gripe) 1, proteína p78 inducible por interferón (ratón)	MX1	0,003908144	2,722	1,000	Síndrome de Sjogren
204972_at	2'-5'-oligoadenilato sintetasa 2, 69/71 kDa	OAS2	0,00753208	2,590	1,000	Síndrome de Sjogren
214059_at	Proteína inducida por interferón 44	IFI44	0,039282229	2,477	0,750	Síndrome de Sjogren
202145_at	complejo 6 de antígeno de linfocitos, locus E	LY6E	0,01319652	2,418	0,750	Síndrome de Sjogren
202869_at	2',5'-oligoadenilato sintetasa 1, 40/46 kDa	OAS1	0,022562072	1,796	0,250	Síndrome de Sjogren
219684_at	proteína 4 transportadora de receptor (quimiosensorial)	RTP4	0,231709806	1,749	0,250	Síndrome de Sjogren
241916_at	Fosfolípido escramblasa 1	PLSCR1	0,472321498	1,284	0,000	Síndrome de Sjogren
241812_at	Proteína 6 transactivada por ADN polimerasa	DNAPTP6	0,529363363	0,917	0,000	Síndrome de Sjogren
205569_at	proteína de membrana 3 asociada con lisosomas	LAMP3	0,318182147	0,905	0,000	Síndrome de Sjogren

Se descubrió que la proporción de sujetos con LES, DM, PM, SSc y AR que eran positivos para la activación de la ruta de IFN de tipo I en SE era del 72 % para LES, del 66 % para DM, del 61 % para PM, del 50 % para SSc y del 33 % para AR. Se observó la sobreexpresión concordante de transcritos inducibles con IFN de tipo I tanto en el tejido implicado como en SE.

A partir de estos estudios, se observó de forma consistente la activación de la ruta del IFN de tipo I en una población de sujetos con LES, DM, PM, SSc y AR. Los subgrupos de sujetos con PM y AR también mostraron activación de la ruta de TNF- α y un subgrupo de sujetos con SSc mostró una fuerte activación de la ruta de IL-17. Un conjunto común de 36 transcritos inducibles por IFN de tipo I se encontraba entre los transcritos más sobreexpresados en la SE de los sujetos. De esta manera, estos estudios muestran que es posible clasificar a todos los sujetos con diferentes manifestaciones de enfermedad por características moleculares, en lugar de que se presente la nomenclatura clásica LES, DM, PM, SSc y AR.

B. Resultados

En la Figura 11A se muestran las puntuaciones para las firmas de genes inducibles por IFN de tipo I calculadas usando los cinco genes inducibles por IFN de tipo I en la SE de sujetos individuales con LES, DM, PM, SSc y AR y sujetos sanos. Las puntuaciones compuestas de la expresión relativa de múltiples genes pueden proporcionar una medición fiable de la actividad de la ruta. Los pacientes con las puntuaciones compuestas de más de 4 se consideraron positivos para la firma de genes inducibles por IFN de tipo I. El umbral para el estado positivo/negativo para la firma de genes de IFN de tipo I usando el panel de 5 genes se determinó usando la distribución de valores de firma de los donantes sanos normales. Como el tamaño de muestra para estos 24 donantes sanos normales es modesto, se construyó una estimación conservativa para un umbral de estado de firma. El máximo de los valores de firma de genes de IFN de tipo I en los donantes sanos normales es 3. Un límite de 4 permite una variación adicional que probablemente esté más alineada con la población general. Las puntuaciones para la sobreexpresión de firmas de genes inducibles por IFN de tipo I en la SE de estos sujetos fueron significativas cuando se compararon con las de los sujetos sanos (las medianas de las puntuaciones para sujetos normales sanos, con LES, DM, PM, AR y SSc son 1,1, 34,5, 12,4, 5,3, 2,3 y 4,3, respectivamente; los valores de p son $7,8310^{-47}$, $7,5310^{-7}$, $6,6310^{-4}$, $4,7310^{-5}$ y $5,2310^{-4}$, para sujetos con LES, DM, PM, AR y SSc, respectivamente).

Para cada enfermedad autoinmunitaria, el porcentaje de sujetos que recibieron una puntuación que hizo que se clasificaran como “positivos para la firma” para la activación de las rutas de IFN de tipo I se obtuvo usando la puntuación de firma de IFN de tipo I de 5 genes (Tabla 4). Los pacientes que son positivos para la firma para la activación de la ruta de IFN de tipo I dentro de cada enfermedad autoinmunitaria son: 73 % LES, 66 % DM, 61 % PM y 50 % SSc, 33 % AR. Este método para identificar sujetos similares con una firma positiva (o firma negativa) sugiere una sólida presencia de sobreexpresión de genes de IFN de tipo I en un subgrupo específico de estas enfermedades autoinmunitarias.

Tabla 4. Porcentajes de sujetos con una firma positiva de genes inducibles por IFN de tipo I en controles sanos normales y en las enfermedades LES, DM, PM, AR y SSc en la SE

Firma	Donantes normales	LES	DM	PM	AR	SSc
Firma de IFN de tipo I	0,0 %	72,5 %	65,9 %	60,6 %	32,6 %	50,0 %
Tamaño de muestra	24	262	44	33	89	38

También se evaluó la sobreexpresión de genes inducibles por IFN de tipo I en tejidos de sujetos con enfermedad (piel lesionada de sujetos con LES y SSc, muestras de músculo de sujetos con DM y PM, y tejido sinovial de sujetos con AR). Se usó la estimulación *in vitro* de un modelo humano primario de queratinocitos/fibroblastos y la línea celular muscular de mioblastos (SkMC) con IFN- α o IFN- β para identificar los posibles transcritos inducibles por IFN de tipo I en células características de la piel y músculo. La mayoría de los transcritos inducidos por IFN de tipo I en las células de piel o líneas de células musculares residentes también fueron inducibles en la SE (los datos de piel se describieron en Yao Y, Jallal J, *et al.* Type I IFN as a potential therapeutic target for psoriasis. PLoS ONE 2008; 3(7): e2737. doi:10.1371/journal.pone.0002737). En los siguientes tamaños de muestras, 16 LES, 37 DM, 36 PM, 22 SSc y 20 AR, se observó una alta sobreexpresión de genes inducibles por IFN de tipo I en los sitios de enfermedad en un gran subgrupo de sujetos con LES, SSc, DM, PM y AR que se evaluaron (valores de $p < 0,01$ para sujetos con LES, SSc, DM y PM, respectivamente; las medianas de las puntuaciones de firma de IFN de tipo I de 5 genes son 0,8, 13,6, 4,5 en piel de donantes sanos normales, sujetos con LES y SSc; 0,9, 15,3 y 5 en muestras de músculo de donantes sanos normales, sujetos con DM y PM; 1,0 y 7,1 en tejidos sinoviales y donantes sanos normales y sujetos con AR (la comparación de AR tuvo un tamaño de muestra del control normal demasiado pequeño como para evaluarse); Figura 11 B).

En un análisis entre los pacientes que tienen firmas de genes inducibles por IFN de tipo I positivas (usando la firma de 5 genes) en SE correspondiente y muestras de tejidos enfermos, 13 de 16 sujetos con LES mostraron puntuaciones de firma de genes inducibles por IFN de tipo I comparables en SE y piel lesionada ($P < 0,05$ usando el ensayo exacto de Fisher). Para los 10 sujetos con DM y 9 sujetos con PM con muestras de SE y músculo emparejadas, 2 muestras de músculo con DM, 1 músculo con PM y 1 muestra de SE de PM (del mismo paciente) fueron negativas para una firma de genes inducibles por IFN de tipo I. Para los 10 sujetos con SSc con muestras emparejadas de SE y piel, 7 sujetos demostraron puntuaciones de firma de genes inducibles por IFN de tipo I comparables. Estas observaciones muestran una fuerte tendencia de expresión concordante de genes inducibles por IFN de tipo I en SE y tejidos enfermos de sujetos con LES, DM, PM y SSc.

En un análisis adicional, se estudió la firma de cuatro genes (IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2) y se determinó si también muestra una fuerte tendencia de expresión concordante de los cuatro genes inducibles por IFN de tipo I en SE y tejidos enfermos de sujetos con LES, DM, PM y SSc. Véanse las Figuras 12A y B.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> MEDIMMUNE, LLC
- <120> DIAGNÓSTICO DE INTERFERÓN
- <130> MED0217.PCT4
- <140>
- <141>
- <150> 61/239.630
- <151> 03-09-2009
- <160> 35

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

10 <400> 1
 gctaccacat ccaaggaagg 20

<210> 2
 15 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 20 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda sintética

<400> 2
 cgcaaattac ccaactccga ccc 23

25 <210> 3
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 3
 35 gcctcgaaag agtctgtat tg 22

<210> 4
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 4
 45 acagagcctc gccttg 17

<210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda sintética

<400> 5
 55 agctggcggc ggggtg 18

<210> 6
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 6
 65 ccttgacat gccggag 17

ES 2 613 055 T3

5
<210> 7
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 7
10 acatcgctca gacaccatg 19

<210> 8
<211> 23
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda sintética
20

<400> 8
ccgttgactc cgaccttcac ctt 23

<210> 9
<211> 20
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
30

<400> 9
accagagtta aaagcagccc 20

<210> 10
<211> 24
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
40

<400> 10
tgggtgtgaa ccatgagaag tatg 24

<210> 11
<211> 29
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda sintética
50

<400> 11
55 cctcaagatc atcagcaatg cctcctgca 29

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 12
65 caggggtgct aagcagttgg 20

ES 2 613 055 T3

5
<210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

10
<400> 13
ctctcacctc atcagcagtg 20

15
<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda sintética

20
<400> 14
ccagaggcca cctgaccac 20

25
<210> 15
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

30
<400> 15
tcacaactgt agcaatcctg g 21

35
<210> 16
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

40
<400> 16
gatgccaaga ttactggat g 21

45
<210> 17
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda sintética

55
<400> 17
agttctcaag gcagacagta agctcttc 28

60
<210> 18
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

65
<400> 18
tgttgaacca gggatccata tg 22

ES 2 613 055 T3

5
<210> 19
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

10
<400> 19
aagccgtagt ggggtct 17

15
<210> 20
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda sintética

20
<400> 20
tataccgctc gggtatgctg gtg 23

25
<210> 21
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

30
<400> 21
aacataaatg gcagagattt tcca 24

35
<210> 22
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

40
<400> 22
aaagactct acctattct ggatg 25

45
<210> 23
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda sintética

55
<400> 23
ctgaactgta gaaaggacg gaaggac 27

60
<210> 24
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

65
<400> 24
cttctacacc aacatccagg a 21

ES 2 613 055 T3

<210> 25
<211> 665
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 25

gggaacacat ccaagcttaa gacggtgagg tcagcttcac attctcagga actctcttc 60
ttgggtctg gctgaagttg aggatctctt actctctagg ccaeggaatt aaccgagca 120
ggcatggagg cctctgcct caccctca ca gcaatgacca gctggccaa agtggcagg 180
gtggcctctg gctctgccgt agtttgccc ctggccagga ttgctacagt tctgattga 240
ggagtgtgg ccaatggggc tctgcccag gctcctcag ccaatgggctt caatggggc 300
ggaatgcct cgtctccat agcagccaag atgatgtccg cggcggccat tgccaatggg 360
ggtggagttg cctcgggcag cctgtggct actctgcagt caatgggagc aactggactc 420
tccgattga ccaagttcat cctgggctcc attgggtctg ccattgcggc tctcattggc 480
aggttctact agctccctgc cctcgcct gcagagaaga gaacctgcc aggggagaag 540
gcaccagcc atctgacc agcaggagc caactatccc aaatatacct ggggtgaaat 600
ataccaaatt ctgcatctcc agaggaaaat aagaataaa gatgaattgt tgcaactctt 660
caaaa 665

10

<210> 26
<211> 656
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 26

ES 2 613 055 T3

gggaacacat ccaagcttaa gacggtgagg tcagcttcac attctcagga actctccttc 60
ttgggctcg gctgaagttg aggatctctt actctctagg ccacggaatt aacecgagca 120
ggcatggagg cctctgctct cacctcatca gcagtgacca gtgtggccaa agtggtcagg 180
gtggcctctg gctctgcect agttttgccc ctggccagga ttgctacagt tctgattgga 240
ggagttgigg ctgtgccat ggtgctcagt gcatgggct tactgcggc gggaatgcc 300
tctctctcca tagcagccaa gatgatgtcc gcggcggcca ttgccaatgg gggtgagtt 360
gcctcgggca gccctgtggt tactctgcag tactgggag caactggact ctccggattg 420
accaagtca tcttgggctc cattgggtct gccattcgg ctgtcattgc gaggttctac 480
tagctcctg cccctgccc tgcagagaag agaaccatgc caggggagaa ggcaccagc 540
catctgacc cagcgaggag ccaactatcc caaatatacc tggggtgaaa tataccaat 600
tctgcatctc cagaggaaaa laagaaataa agatgaattg ttgcaactct tcaaaa 656

5

<210> 27
<211> 1742
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 27

ES 2 613 055 T3

tcttgaagc tcaaggctg ctgaataatt tectctccc attttgtgcc tgcctagcta 60
 tccagacaga gcagctaccc tcagctclag ctgatactac agacagtaca acagatcaag 120
 aagtatgga gtgacaacic gttfgacatg gttgcacgaa aagatccctgc aaaateattt 180
 tggaggggaag cggcttagcc ttctctataa gggtagtctc catggattcc glaattggagt 240
 ttfgcttgac agatgttga atcaagggcc tactctaaac gtgattata gtgaagatca 300
 tattattgga gcatatgcag aagagagtta ccaggaagga aagtatgctt ccatcatcct 360
 ttftgcactt caagatacta aaatttcaga atggaaaacta ggactatgta caccagaaac 420
 actgttttft tglgatgta caaaafataa ctcccact aattccaga tagatggaag 480
 aaalagaaaa gtgattatgg actlaaagac aatggaaaal ctggacttg ctcaaaattg 540
 tactatctct attcaggatt atgaagtitt tcatgctgaa gattcactgg atgaaagaaa 600
 gataaaaggg gtcattgagc tcaggaagag ctctactctt gccctgagaa ctatgaacc 660
 atatggatcc ctggttcaac aaatacgaat tctgctgctg ggtccaattg gagctgggaa 720
 gtccagcttt tcaactcag tgaggctctg ttccaaggg catgtaaccg atcaggcttt 780
 ggtgggcact aalacaactg ggatactga gaagtatagg acatactcta tttagagacgg 840
 gaaagatggc aalaccctgc cgtttattct gtgtgactca ctggggctga gtgagaaaga 900
 aggcggcctg tgcagggatg acatattcta tacttgaac ggtaaacatc gtgatagata 960
 ccagttaat cccatggaat caatcaaat aaatcatcat gactacattg attcccac 1020
 gctgaaggac agaattcatt gtgtggcatt tgtattgat gccagctcta ttcaalact 1080
 ctctctcag atgatagtaa agatcaaaag aattcgaagg gatttggtaa acgctggtgt 1140
 ggtacatgtg gctttgctca ctcaigtgga tagcatggat ttgattaca aaggtagcct 1200
 tatagaaata gagagatgtg agcctgtgag gtccaagcta gaggaagtec aaagaaaact 1260
 tggatttctt ctctctgaca tctcgggtgt tagcaattat tctctgagt gggagctgga 1320
 cctctgaaag gatgttctaa ttcttctgc tctgagacga atgctatggg ctgcagatga 1380
 ctcttagag gatttgcctt ttgagcaaat agggaatcta agggaggaaa ttatcaactg 1440
 tgcacaagga aaaaaalaga tatgtgaaag gttcacgtaa atttctcac atcacagaag 1500

ES 2 613 055 T3

atfaaaattc agaaaggaga aaacacagac caaagagaag tatctaagac caaagggatg 1560

tgttttatta atgtctagga tgaagaaatg catagaacat tgtagtactt gtaaataact 1620

agaaataaca tgattlagtc ataattgiga aaaataalaa taatttttct tggalltaig 1680

ttctgtatct gtgaaaaaat aaatttctta taaaactcgg gtctaaaaaa aaaaaaaaaa 1740

aa 1742

- 5 <210> 28
- <211> 5889
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*

- <400> 28

ES 2 613 055 T3

gctgccagct gagtttttt gctgcttga gtctcagtt tctttcttc ctagagtctc 60
tgaagccaca gatctcttaa gaactttctg tetccaaacc gtggctgctc gataaatcag 120
acagaacagt taalctctaa ttaagcctg atctaaccctc tagaaacaga tatagaacaa 180
tggaaagtac aacaagattg acatggaatg atgaaaatca tctgctgcaag ctgcttggaa 240
atgtttcttt gagtctctc tataagtcta gtgttcattg aggttagcatt gaagatatgg 300
ttgaaagatg cagcctcag gtagtacta taacaalgge ttacattgat tacaatalga 360
ttgtagcctt tatgcttggg aattatatta atttacctg aagtctaca gagccaaatg 420
atctctatg gtttctact caaaagaaaa atgacaccac tgaatalaga acitctactc 480
taataacagc accaaaaatt atgtagcagc aactgggtgg tcttttctc aaaacggata 540
tttctattt atgtcagat aataaaatt atctagataa aatgataaca agaaacttga 600
aactaaggtt ttatggccac cgtcagtatt tggaaatgta agttttctga gttgaaggaa 660
ttaaggataa cctagaccac ataaagagga taattaaage cagagagcag agaaatagge 720
ttctagcaga catcagagac tatagccct atgcagactt ggtttcagaa atctgtatc 780
ttttgggtggg tccagttggg tctggaagt ccagttttt caattcagtc aagtctattt 840
ttcatggcca tgtgactggc caagccgtag tggggtctga tctaccagc ataaccgagc 900
gglataggat atattctgtt aaagatggaa aaaatggaaa atctctgcca ttatgttgt 960
gtgacactat ggggctagat ggggcagaag gagcaggact gtgcatggat gacattcccc 1020

ES 2 613 055 T3

acatctaaa aggtgtatg ccagacagat atcagtttaa tteccgtaa ccaattacac 1080
 ctgagcatic tactttate accttccat ctctgaagga caggaticac tgtgtggctt 1140
 atgtettaga catcaactt atlgacaalc tctactclaa aatgttgca aaagtgaage 1200
 aagticacaa agaagtalla aactgtggta tagcatatgt ggctttgctt actaaagtgg 1260
 atgaitgcag tgaggftct caagacaact tttaaacat gagtagatct atgacttctc 1320
 aaagccgggt catgaatgc cataaaatgc taggcatcc tattccaat atttgatgg 1380
 ttgaaacta tgcctcagat ttggaactgg acctcatgaa ggatattctc atctctctg 1440
 caclgaggca gatgtgcgg gctgcagatg atttttaga agattgctt ctgaggaaa 1500
 ctgglgcaat tgagagagcg ttacagccct gcattigaga taagttgctt tgattctgac 1560
 atttgcecca gctgtactg gtgtccgca atgagagica atctctattg acagcctgct 1620
 tcagatttg ctttgtctg tttgcctt tctcttggga acagtcata ctaagtca 1680
 aaggccaaaa ctgagaage ggtgggclaa galaggtctt acigcaaacc acctctcat 1740
 atttccgtac cattacaat tcagttctg tgacatctt taaaccact ggaggaaaa 1800
 tgagatctc tcaatttat tctctataa cactctatat agagctatgt gactactaat 1860
 cacaltgaal aatagttata aaattattgt atagacatct gctctfaaa cagattgtga 1920
 gtctttgag aaacagcglg gattttactt atctgtgat tcacagagct tagcacagtg 1980
 cctggtaatg agcaagcata ctgccafta ctfttcttcc cactctctc caacatcaca 2040
 ttcactflaa attttctgt atatagaaag gaaaactagc ctgggcaaca tgatgaaacc 2100
 ccatctccac tgcataaaaa aaaaaaaaaa ataagaaaga acaaaacaaa cccacaaaa 2160
 attagctggg tatgatggca ctgacctgta gtcccagta ctaggatga ttgattgagc 2220
 ctggagggtg gaggctacag tgagctgaga ttgtccact gtactctagc caggagaaa 2280
 gagtgaatc ctggctcaaa aaaaccaaataaaaacaaac aaacaaacga aaaacagaaa 2340
 ggaagactga aagagaatga aaagctgggg agaggaaata aaaaataaga aggaagagtg 2400
 ttcaattat atctgaatga aaatatgaat gactctaagt aattgaatta affaaaatga 2460
 gccaaacttt tttaacaat ttacatttta ttctatggg aaaaaataaa tattctctt 2520

ES 2 613 055 T3

ctacaaaacc catgeffgat ffccattaat lgaaltccaa atcalectag ccatgtgicc 2580
 ffccattlag gttactgggg caaatcagta agaaagtct talattfatg ctccaaataa 2640
 ffctgaagtc ctctactag ctgtgaaagc tagtactatt aagaagaaa acaaaaatcc 2700
 caaaagatag ctffcacttt ftttttcccl taaagaellc claatctcl lclccaaatt 2760
 cttagtelle llcaaaaata tatgctllgg tlcaatagtl atccacalle tgacagtcta 2820
 atttagtttt aatcagaatt atactcatcl tllgggtagt catagatatt aagaagcaa 2880
 gagtttctta tglccagta tggaatattl cctaaagcaa ggctgcaggt gaagtgtgic 2940
 tcaagtgaat glfcaggaga cacaattcag tggaagaaal laagtctta aaaaagacct 3000
 aggaatagga gaacctgga aattgaggag gtaggcctac aagtagatat tgggaacaaa 3060
 allagagagg caaccagaaa aagllattll aggetcacca gagttgtlct tattgcacag 3120
 taacacacca atataccaaa acagcaggta ttgcagtaga gaaagagttt aataattgaa 3180
 tggcagaaaa atgaggaagg ttgaggaaac ctcaaatcta cctccctgct gaglctaagt 3240
 ttaggatttt taagagaaag gcaggtaagg tgctgaaggf ctggagctgc tgattgttg 3300
 gggfataggg aatgaaatga aacalacaga gatgaaaact ggaagtttt tttgtttgt 3360
 ttgttttt tttgtgtt gttttttt tttttgtt tttgctgag tcaatlectt 3420
 ggagggggic tteagactga ctggtgicag cagacctatg ggattccaag atctggaaaa 3480
 ctftttagat agaaactga tgttcttaa cgttacatal attatcttal agaaataact 3540
 aagggaagtt agtgcctgtg gaccacatcl atgtactll taggcagtaa gaaactataa 3600
 ggaaaggagc taacagtccl gctglaagta gctacaggga attggctflaa agggcaagtt 3660
 ggttagtact tagctgtgtt fttattcaaa gctacattt tatgtagtgg ttaatgttg 3720
 ctgttcatta ggalggfltc acagttacca taaaaatga gaagcaacag gtccaaaaag 3780
 tagggcatga fttctccal gtaatccagg gagaaaacaa gccatgacca ttgttggtg 3840
 ggagactgaa ggtgattgaa ggllccat catectcacc aactlltggg ccalaattca 3900
 cccaacctt tggggagcc tgaaaaaat ctgggcagaa ttaggactt cttattttg 3960
 tttaaagggg taacacagag tcccctfatg aaggagtgg agalcctgca aggaagagaa 4020

ES 2 613 055 T3

ggagtgaagg agagatcaag agagagaaac aatgaggaac atttcatttg acccaacatc 4080
 ctttaggagc ataaatgttg acactaagtt aicccctttg tgclaaaaig gacagtattg 4140
 gcaaaatgat accacaactt cttattctct ggctctatat tgccttggaa acactaaac 4200
 atcaaalgga gtlaaalaca tatttgaat ttaggllagg aaatattggt gaggagcct 4260
 caaaaagggg gaaacatctt ttgtctggga ggalatttc catittgtgg atttccctga 4320
 tcttttcta ccacctgag ggggtgtggg aattatcatt tgcctacatt tttaggtca 4380
 tccaggattt ttgaaacttt acattctta cggtaagca agatgtacag ctacagcaaa 4440
 gacactaaat tctcttaga aaaatagtc taaggagtat agcagatgac ctatatgtgt 4500
 gttggctggg agaatacat cttaaagtga gagtgatgtt gtggagacag ttgaaatgtc 4560
 aatgctagag cctctgtgtt gtgaatgggc acgttaggtt gttgcattag aaagtactg 4620
 ttctgacag aaattgttag cttgtgcaa actcaccac cactaccct aataaaatat 4680
 agagaaaaga aaaatagagc agttttagtt ctatgaggta tgcaggccca gagagacata 4740
 agtatgtcc tttagcttg ctctctgtgt gccacactgc cctccacaa ccatagctgg 4800
 gggcaattgt ttaaagtcatt ttgttccc actagctgcc ttgcacatta tcttcatttt 4860
 cctggaattt gatacagaga gcaatttata gccaatgat agcttatgct gtttcaatgt 4920
 aaattctgg taaataactt aggaactgcc tctcttttt ctttgaanaac ctactataa 4980
 ctgttctaa taagaatgtg tattgttcag gacaactgtt ctccatacag ttgggttcta 5040
 accctcatge ttggcccaaa taaactctct acttataca gtttttcta cactcttcc 5100
 ttttaggtca acaataccaa gaggggttac tgfctgggt aatgtgtaa cttgtgtctt 5160
 gttfagaag ataaatttaa agactatcac attgctttt cataaaaca gacaggtcta 5220
 caattaattt atttgacgc aaattgatag gggggccaag taagcccat atgcttaatg 5280
 atcagctgat gaataatcat ctccagcaa cataactcaa tctaatgcta aggtaccac 5340
 aagatggcaa ggcctgacaa aglctcaltg gaatcctgca accaaaagcc atgggaattt 5400
 ggaagccctc aaatccatt cctaactga tgagctatg gaccaatttg tggaggacag 5460
 tagatfaaat agatctgatt ttgccaatca atgtaaggag gataaaaact tgcataccaa 5520

ttgtacacce ttgcaaaatc tttctctgat gttggagaaa atgggccagt gagatcatgg 5580
 atatagaagt acagtcaatg ttcagctgta ccctcccaca atcccacttc ctctctcaac 5640
 acaattcaaa caaatagact cagactgttt caggetccag gacaggaagt gcagtgtagg 5700
 caaaattgca aaaattgagg gcacaggggt ggaggtgggg gggltgaata acaagctgtg 5760
 ctaaataatt acgtglaaat atatttttc attttaaaa attgatttet tttgcacatt 5820
 ccatgacaat atatgtcaca tttttaaataaat aatgcaaag aagcatacat ccaaaaaaaaa 5880
 aaaaaaaaa 5889

5 <210> 29
 <211> 836
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 29

ccagccttca gccggagaac cgttacteg ctgctgtgce catctatcag caggctccgg 60
 gctgaagatt gcttctctc tctctccaa ggtctagtga cggagcccg gcgcggcgcc 120
 accatgcggc agaagcgggt atcgctttc ttgtctacc tgctgctctt cacttcagt 180
 ggggtggagg caggtaaaga aaagtctcg gagagctcgg acagcgctc cgggttctgg 240
 aagccctga cctcatggc cgtcggagga ggactcgcag tcgccgggt gcccgctg 300
 ggcttcaccg gcgccggcat cgcggccaac tcggtggetg cctcctgat gagctggtet 360
 gogatcctga atgggggagg cgtcccccc ggggggctag tgcccacgt gcagagcctc 420
 ggggctggtg gcagcagct cgtcataggt aatattggtg cctgatggg ctaccacc 480
 cacaagtatc tcatagtga ggaggatgag gattagccag cagctcccag aaectctct 540
 tcttcttg ctaactctt ccagtagga tetagaact tgccttttt tttttttt 600
 ttttttgag atgggtctc actatattgt ccaggetaga gtgcagtgc tttcacaga 660
 tgccaacata gtacactgca gctccaact cctagcctca agtgatctc ctgtctcaac 720
 ctccaagta ggattacaag catgcgccga cgtgcccag aatccagaac tttgtctatc 780
 actctccc acaacctaga tgtgaaaaca gaataaactt cacceagaaa aactt 836

10 <210> 30
 <211> 848

ES 2 613 055 T3

<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 30

5

ccagcctca gccggagaac cgttactcg ctgctgtgcc catctatcag caggeccgg 60
gctgaagatt gctctcttc tctctccaa ggtctagtga cggagcccgc gcgcggcgcc 120
accatcgggc agaaggcggg atcgctttc ttgtctacc tctctctt cacttgcagt 180
gggggtggagg cagggtgaaa tgcgggtaag aaaaagtgct cggagagctc ggacagcggc 240
tccgggttct ggaaggcctt gacctcatg gccgleggag gaggactcgc aglcgccggg 300
ctccccgcgc tgggcttca cggcgccggc atcgccggca acleggtggc tgcctcctg 360
atgagctggt ctgcatact gaatgggggc gccgtgcccg cgggggggct agtgggcaag 420
ctgcagagcc tcggggctgg tggcagcagc gtcgtcatag gtaataatgg tgcctgatg 480
ggctacgcca cccacaagla tctgatagc gaggaggatg aggaglagcc agcagctccc 540
agaacctctt ctctctctt ggcctaactc tccagttag gatctagaac ttgctcttt 600
tttttttt tttttttg agatgggttc tcaatatatt gtccaggeta gagtgcagtg 660
getatcaca gatggaaca tagtacctg cagctccaa ctctagcct caagtatcc 720
tctgtctca acctcccaag taggattaca agcatgcgcc gacgatgcc agaatccaga 780
actttgtcta tcactctccc caacaacctg gatgtgaaaa cagaataaac ttcaccaga 840
aaacactt 848

<210> 31
<211> 860
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 31

10

ccagcctca gccggagaac cgttactcg ctgctgtgcc catctatcag caggetccgg 60
gctgaagatt gctctcttc tctctccaa ggtctagtga cggagcccgc gcgcggcgcc 120
accatcgggc agaaggcggg atcgctttc ttgtctacc tctctctt cacttgcagt 180

15

ES 2 613 055 T3

ggggtggagg caggtgagaa tgcgggtaag gatgcaggta agaaaaagt ctcggagagc 240
 tcggacagcg gctccggglt ctggaaggcc ctgacctca tggccgtcgg aggaggactc 300
 gcagtcgccg ggctgcccg gcctgggcttc accggcgccg gcctcgcggc caactcggtg 360
 gctgcctcgc tcatgagctg gctcgcgac ctgaatgggg gcggcgtgcc cgcggggggg 420
 ctatggcca cgctgcagag cctcggggct ggtggcagca gcctcgtcat aggtaatatt 480
 ggtgccctga tgggctacgc caccacaag tatctcgata gtgaggagga tgaggagtag 540
 ccageagctc ccagaacctc ttctctctc ttggcctaac tctccagtt aggatctaga 600
 actttgctt tttttttt tttttttt tgagatgggt tctactata ttgtccagc 660
 tagatgcag tggctattca cagatcggaa catagtacac tgcagcctcc aactcctagc 720
 ctcaagtgat cctcctgct caacctccca agtaggatta caagcatcg cgcagcatgc 780
 ccagaatcca gaactttgc tctactctc cccaacaacc tagatgtgaa aacagaataa 840
 acttaccca gaaaacctt 860

- 5
- <210> 32
 - <211> 3512
 - <212> ADN
 - <213> *Homo sapiens*
 - <400> 32

ES 2 613 055 T3

aactcagctg agtgltagtc aaagaaggcg tgcctgctc cccaatgaca gggtgctcag 60
agactgctga ttccatccc tatataaaga gagtccctgg catacagaga ctgctctgct 120
ccaggcatct gccacaatgt ggggtgcttac acctgctgct ttgctggga agctcttgag 180
tggttcagg caacctctga gctctctgag gaggagcctg gtcccctgt tctgctgct 240
gagggcaacc ttctggctgc tagctacaa gaggagaaag cagcagctgg tctgagagg 300
gccagatgag accaaagagg aggaagagga cccctctctg cccaccaacc caaccagegt 360
caactatcac ttactegcc agtgcacta caaatgggc ttctgttcc acacagccaa 420
aacatcttt gctctgccc ttgaggaagc aaagagagga ttcttttgc ttaaggaagc 480
tggatggag aagatcaact ttccaggtgg agagccattt ctcaagacc ggggagaata 540
ccgggcaag ttggtgaggt tctgcaagt agagttggcg ctgccagcg tgagcatct 600

ES 2 613 055 T3

gagcaatgga agcctgatcc gggagagggtg gttccagaat tatggtgagi atttggacat 660
 tctcgtatc tctgtgaca gctttgacga ggaagtcaat gtccttattg gccgtggcca 720
 aggaaagaag aaccatgtgg aaaaccttca aaagctgagg aggtggtgta gggattatag 780
 agtcgcttcc aagataaatt ctgtcatfaa tegtftcaac gtggaagagg acatgacgga 840
 acagalcaaa gcaclaaacc ctglccgctg gaaagtgttc cagtgcctcl laattgaggg 900
 tgagaattgt ggagaagatg ctctaagaga agcagaaaga ttgttattg gtgatgaaga 960
 aittgaaaga ttctggagc gccacaaaga agtglcctgc ttgggtcctg aatctaacca 1020
 gaagatgaaa gactcctacc ttattctgga tgaalatatg cgtttctga actglagaaa 1080
 gggacggaag gaccttcca aglccatcct ggatgttggg gtagaagaag ctataaaatt 1140
 cagtggattt galgaaaaga tgtttctgaa gcgaggagga aaatacalat ggagtaaggc 1200
 tgatctgaag ctggattggt agagcggaaa gtggaacgag acttcaacac accagtggga 1260
 aaactcctag agtaactgcc atgtctgca atactatccc gttggtattt cccagtggct 1320
 gaaaacctga tttctgctg cacgtggcat ctgattacct gtggtcactg aacacacgaa 1380
 taacttggat agcaaatcct gagacaatgg aaaaccatta accttacttc attggettat 1440
 aacctgttg ttattgaaac agcaactctg tttttgagtt tgttttaget aaaaagaagg 1500
 aalacacaca ggaataatga ccccaaaaat gettagataa ggcccctata cacaggacct 1560
 gacatttagc tcaatgatgc gtttgaaga aataagctct agtgatalcl gtgggggcaa 1620
 aaiftaattt ggattgatt ttttaaaaca algttactg cgatttetal atttccattt 1680
 tgaaactatt tctgttcca ggtttgttca ttgacagag tcaatatttt ttgccaata 1740
 tccagataac cagtlttcaac atctgagaca ttacaaagta tctgctcaa ttattctgc 1800
 tggftataal gcttttttt ttttgccttt atgccattgc agtctgtac ttttactgt 1860
 galgtacaga aalatgcaac agatgttcc aagaacalal gatagataa tclaccaat 1920
 ttcaagaag tetctagaaa gagalaacac atggaaagac ggtgtggtgc agcccagccc 1980
 accgtggctg ttccatgaat gctggctacc tatgtgtgtg glacctgtg tgtcccttc 2040
 tcttcaaga tctgagcaa aacaaagata cgttttccat ttgatgatgg agttgacatg 2100

ES 2 613 055 T3

gaggcagtgc ttgcattgct ttgttcgct atcatctggc cacatgagge tgtcaagcaa 2160
aagaalagga gtgtagtga gtgctgggt ggccctacat cctcgagaag tgacggcaca 2220
ctgggtggc ataagatac ctaaaatcac gctggaacct tgggcaagga agaattgtgag 2280
caagagtaga gagagtgcc ggatttcag lcagtgaaage caagtcacca taacataatt 2340
ttgaatgaac tctgagtcag ttgaaatagg gtaccatcta ggctcagtta agaagagtea 2400
gctcagagaa ageaagcala agggaaaatg lcacgtaaac tagatcaggg aacaaaatcc 2460
tctccttgg gaaatatccc atgcagttg ttgatacaac ttagtatct atgcctaaa 2520
aaaaaattc ttaacatgt tcaaaaaag caaaatcag gaaaatttt gttgtccagg 2580
caaaataaag gtaatttaa tttagctga attcagtg tectactag gtggcattta 2640
aalgtcct gatgicatta agcaccatcc aaaaagctg ctccataac latllcaag 2700
acttggatg tctgaaagt ttggttttg tgaattgt tctcaggaaa aaaaatatt 2760
ctactaaat ttaagteta taatcaatt laaatalgtg tgtgctcat ccaggatagg 2820
ataggtgtc ttctatttc cattttacct attacttt ttgtaagaa aagagaaaa 2880
tgaatteta agatgtccc catgggttt gattgtct aagctatgat gacctcata 2940
taateagca aacataaaa caaatttt actaacatg agtgcaatt actaatete 3000
atggcacagt ggctcacgce tgaatccca gcactggga ggacaatgt ggtggatcac 3060
gaggtcagga gttcgagaac agcctggcca acatggtgaa acccgtct cactaaaaat 3120
acaaaaata gccagcatg gtggcgtaca ctgtaattc cagctactca agaggtgag 3180
gcaggaggat tgcitgaacc ctgaaggcag aggttacaga gccaagatag cggcactgca 3240
ctccagcctg gatgacagag caagactccg tctcaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaagcaaga 3300
gagttcaact aagaaagtc acatagtg aagcccaagg acactgttg atatacagca 3360
gglattcaat caggttatt tgaacaaaa tctgaattg aagtttgaal ctctgagtt 3420
ggaatgaatt ttttctagc tgagggaaac tgaatttc tttcccaaa gaggaatgta 3480
atgtaaagt aaataaaact ataagctatg tt 3512

<210> 33
<211> 526
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

ES 2 613 055 T3

<400> 33

gaattcggct ttggtgactc tagataacct cgggccgac gcacgcccc cgtggcggcg 60
 acgaccatt cgaactctg ccctatcaac ttctgatggt agtcgccgtg cctaccatgg 120
 tgaccacggt gacggggaat cagggttca ttccggagag ggagcctgag aaacggctcc 180
 acatccaagg aaggcagcag gcgcgcaaat taccactcc cgaccegggg aggtagtac 240
 gaaaaataac aatcaggact ctttcagggc cctgtaattg gaatgagtc accttaaac 300
 ctttacgagg atccattgga gggcaagtct ggtgccagca gccgcggtaa ttccagctcc 360
 aatagcgtat aftaaagtc tgcagttaa aagctcgtag ttggatcttg ggagcgggcg 420
 ggcggtccgc cggagggcag ccaccgccc tcccgcgcc ttgcctctcg gcgccccctc 480
 gatgetctta getgagtgc aaacagagga ttaccatgt aagett 526

5 <210> 34
 <211> 551
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 34

gaattaccg ccgagaccgc gtccgcccc cgagcacaga gctcgcctt tgcgatccg 60
 ccgcccgtcc acaccgccc ccagctcacc atggatgatg atatcggcg gctcgtctc 120
 gacaacgctc cgcatgtgc aaggccggct tcgaggcgca cgalgcccc cgggcccgtt 180
 cccctccalc gtggggcgcc ccaggcacca gggcgtagt glgggcatgg gtcagaagga 240
 ttctatgtg ggcacgaggc ccagagcaag agaggeatcc tcacctgaa gtacccatc 300
 gagcaggcat cgtaccaac tgggacgaca tggagaaaat ctggcaccac acctctaca 360
 atgagctcg tgtggctcc aggagcacc cgtgctctg accagggccc cctgaacce 420
 caaggccaac cggagaagat gaccagatc atgittgaga ccttaaacac cccagecatg 480
 tacgttgcta tccaggtgt gtatctctg acgctctgg ccgtaaacat gaggattacc 540
 catgtaagct t 551

15 <210> 35
 <211> 684
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 35

gaattcaaat tgagcccgea gctcccgcct tgcctctctg ctctctctgt tgcacagca 60
 gccgcatctt ctttgcgic gccagccgag ccacatcgt cagacacat ggggaagggt 120
 aaggctgagt caacggattt ggtcgtattg ggcgcctggt caccagggtt gcttttaacc 180
 tggtaaagt gatattgtt ccatcaatga ccccttcatt gacctcaact acatggttta 240
 catgtccaa tatattccac ccatggcaaa tccatggca ccgtcaaggc tgagaacggg 300
 aagcttgca tcaatggaaa tccatcacc atctccagg agcgagatcc ctccaaaate 360
 aagtggggcg atgctggcgc agtacgtcgt ggagtcact ggcgtctca ccacatgga 420
 gaaggctggg gctcatttc aggggggagc caaaagggtc atcatctctg cccctctgc 480
 tgatceccc atgtctgca tgggtggacc atgagaagta tgacaacagc ctcaagatca 540
 tcagcaatgc ctctgcacc accaactgt tagcaccct ggccaaggtc atccatgaca 600
 acttgggtat cgtggaagga ctcatgacca catcatgcca tcactgccac ccagaagaaa 660
 catgaggatt acctatgtgg atcc 684

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un sujeto adecuado para el tratamiento de lupus con un anticuerpo anti-interferón alfa o un anticuerpo anti-receptor de interferón alfa que modula la actividad del interferón de tipo 1, que comprende detectar el ARNm aumentado de un grupo de genes que consisten en IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2 en una muestra del sujeto, en el que una media de cambio en veces en el ARNm del grupo de genes de al menos cuatro veces indica un sujeto adecuado para el tratamiento de lupus con el anticuerpo, en el que el aumento es relativo a
- 5 a) el de una muestra de un tejido o persona que no tiene la enfermedad, o
 10 b) la expresión de uno o más genes de control.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-interferón es sifalimumab.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-interferón no es sifalimumab.
- 15 4. El método de la reivindicación 1, en el que la detección de ARNm de IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2 comprende
- a) aislar ARN de una muestra obtenida del sujeto;
 b) sintetizar ADNc a partir del ARN;
 20 c) hibridar el ADNc con oligonucleótidos que hibridan con secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 25 a 28 y 32; y
 d) amplificar el ADNc y detectar los productos amplificados.
5. El método de la reivindicación 4, en el que los oligonucleótidos se eligen entre oligonucleótidos que tienen las secuencias de SEQ ID NO: 13 a 24.
- 25 6. Un anticuerpo anti-interferón alfa o un anticuerpo anti-receptor de interferón alfa que modula la actividad del interferón de tipo 1 para uso en el tratamiento de lupus en un sujeto adecuado, en el que el sujeto adecuado para el tratamiento se identifica detectando un nivel aumentado de ARNm de un grupo de genes que consiste en IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2 en una muestra del sujeto, en el que una media del cambio en veces en el ARNm del grupo de genes de al menos 4 veces indica un sujeto adecuado para el tratamiento de lupus, en el que el aumento es relativo a
- 30 a) el de una muestra de un tejido o persona que no tiene la enfermedad, o
 35 b) la expresión de uno o más genes de control.
7. El anticuerpo para uso de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo anti-interferón es sifalimumab.
8. El anticuerpo para uso de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo anti-interferón no es sifalimumab.
- 40 9. El anticuerpo para uso de la reivindicación 6, en el que la detección del ARNm de IFI27, IFI44, IFI44L y RSAD2 comprende
- a) aislar ARN de una muestra obtenida del sujeto;
 b) sintetizar ADNc a partir del ARN;
 45 c) hibridar el ADNc con oligonucleótidos que hibridan con secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 25 a 28 y 32; y
 d) amplificar el ADNc y detectar los productos amplificados.
- 50 10. El anticuerpo para uso de la reivindicación 9, en el que los oligonucleótidos se eligen entre oligonucleótidos que tienen las secuencias de SEQ ID NO: 13 a 24.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el anticuerpo para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que el aumento de ARNm es relativo a muestras reunidas de pacientes sanos.
- 55 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 b) o 2 a 5 u 11, en la medida en que las reivindicaciones 2 a 5 y 11 remiten a la reivindicación 1 b), o el anticuerpo para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 6b) o 7 a 11, en la medida en que las reivindicaciones 7 y 11 remiten a la reivindicación 6b), en el que los genes de control se seleccionan entre ACTB, GAPDH y ARNr 18S.
- 60 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 11 o 12, o el anticuerpo para uso en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en el que la muestra es sangre entera o suero.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 u 11 a 13, o el anticuerpo para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, en el que el sujeto necesita tratamiento de lupus eritematoso sistémico.
- 65

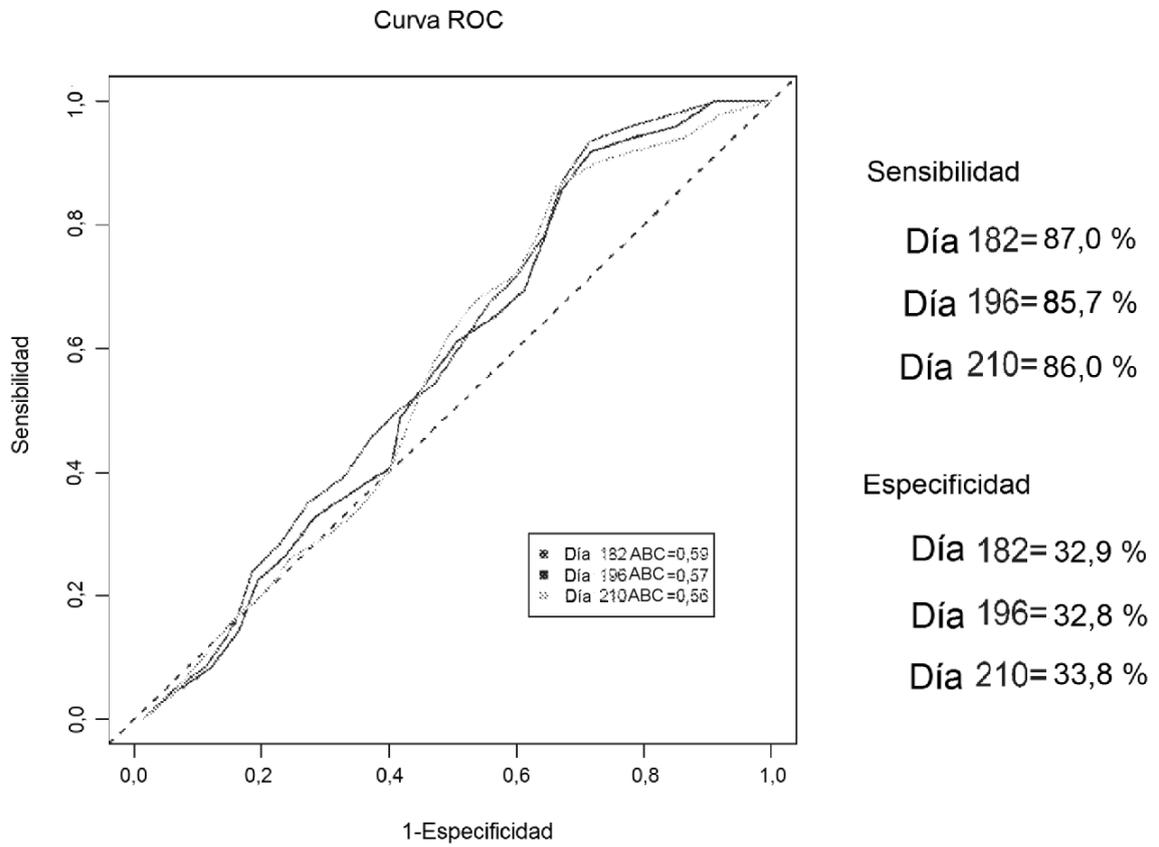


Figura 1

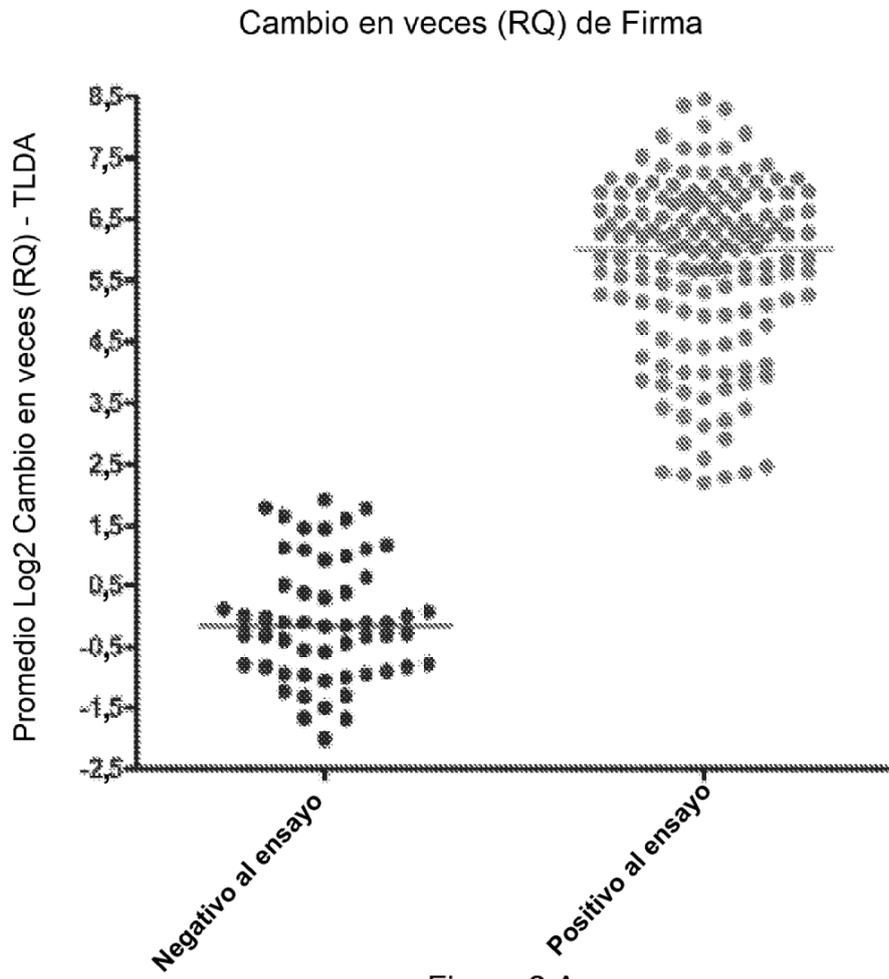


Figura 2 A

Gráfica de Promedio Log2 de cambio en veces de densidad

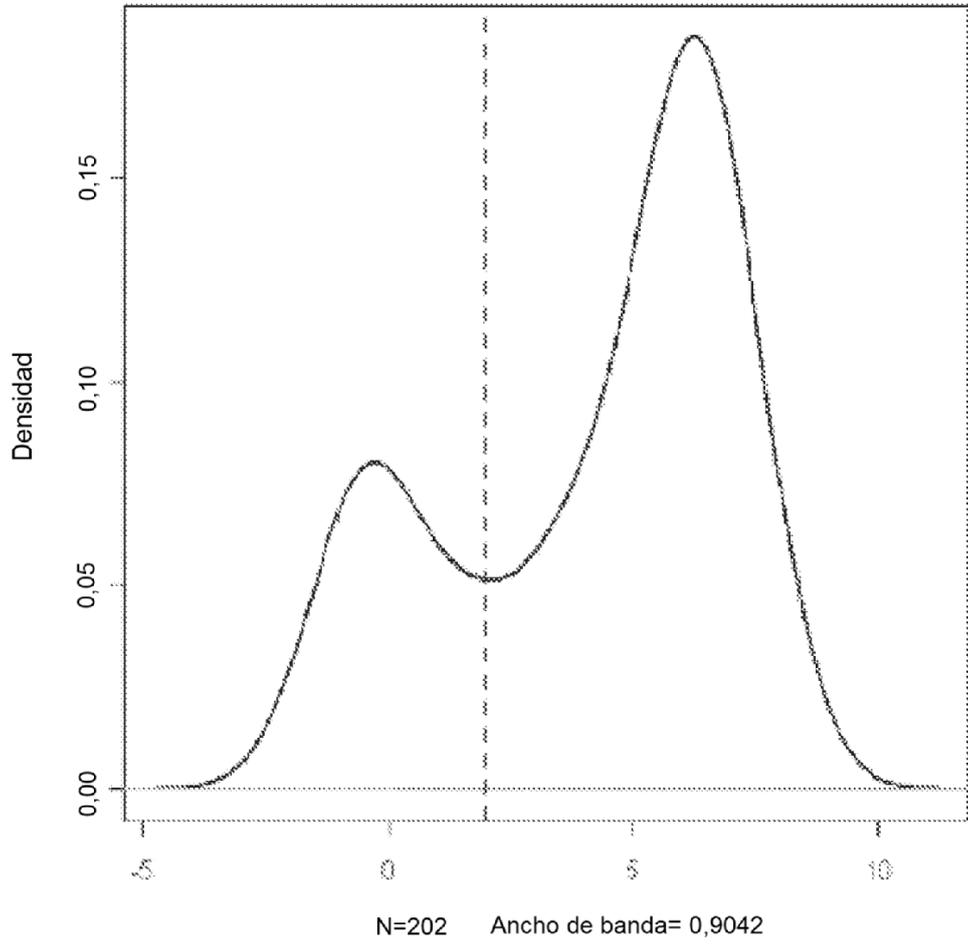


Figura 2 B

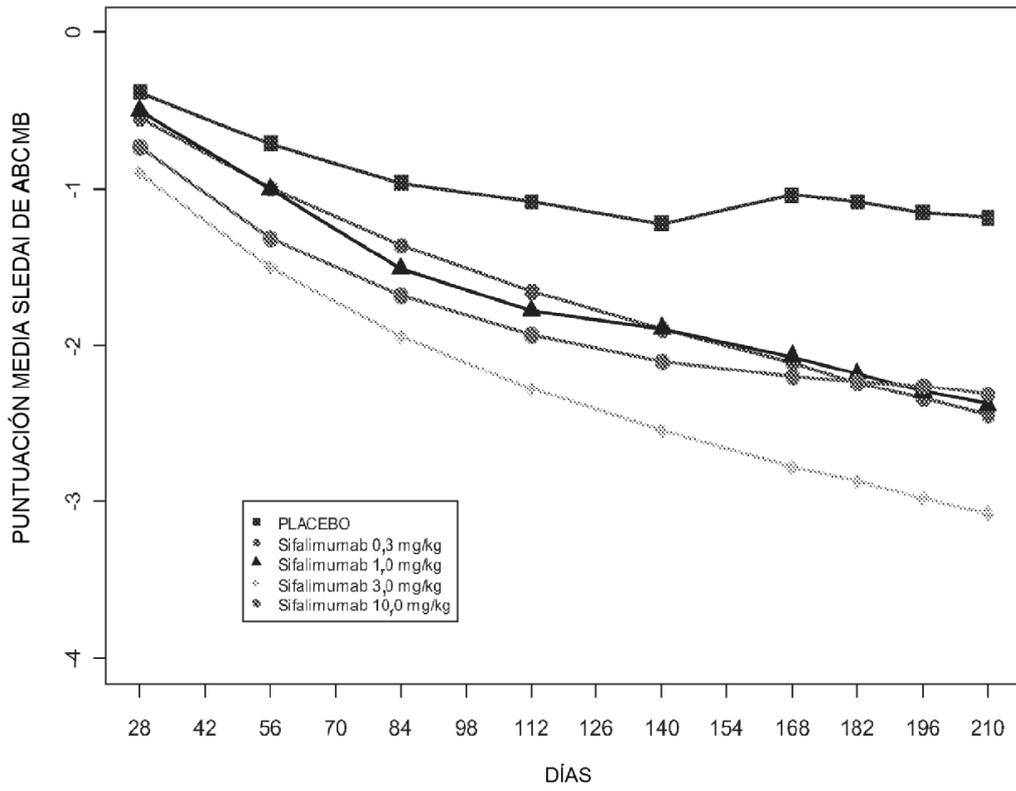


Figura 3 A

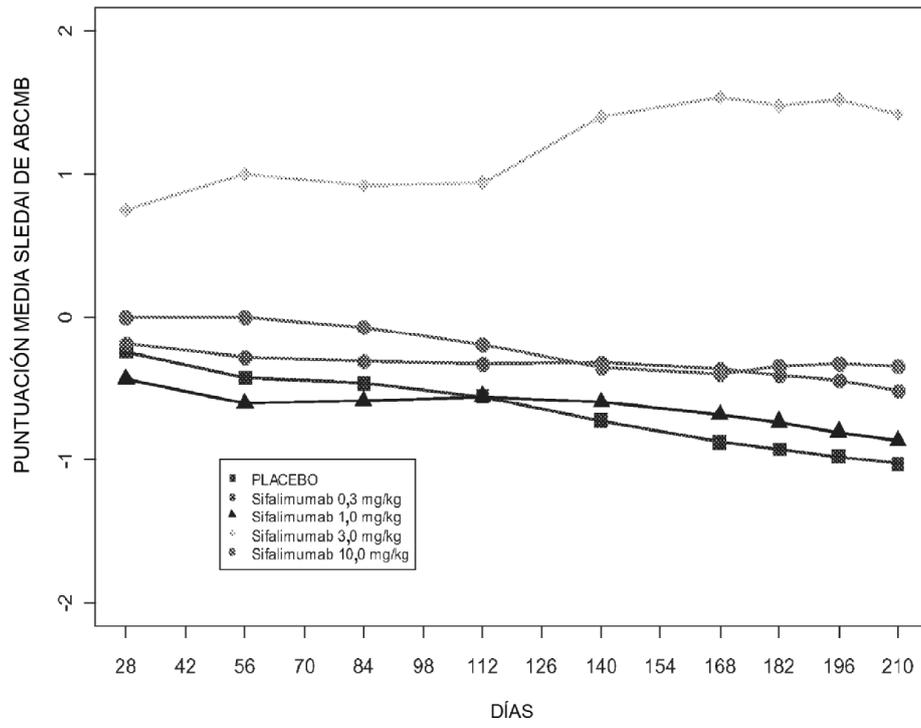


Figura 3 B

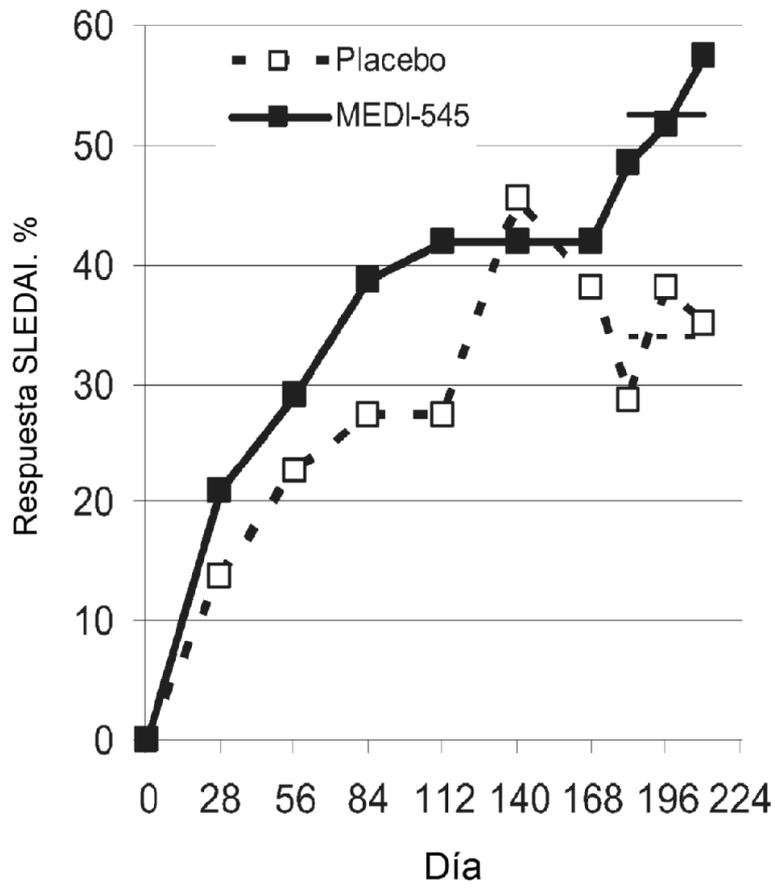


Figura 4 A

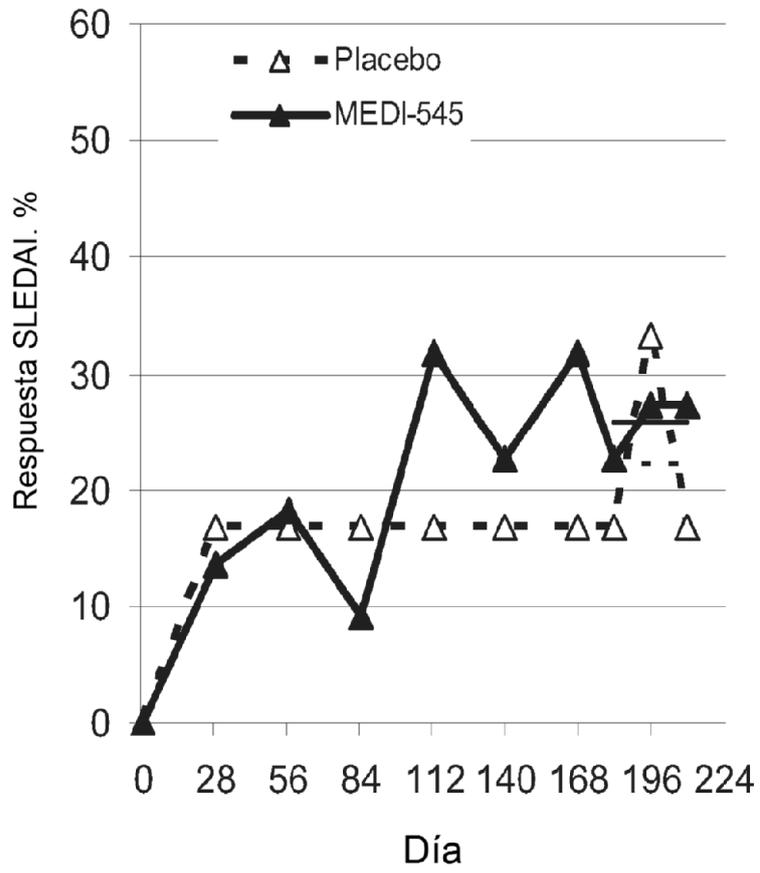


Figura 4 B

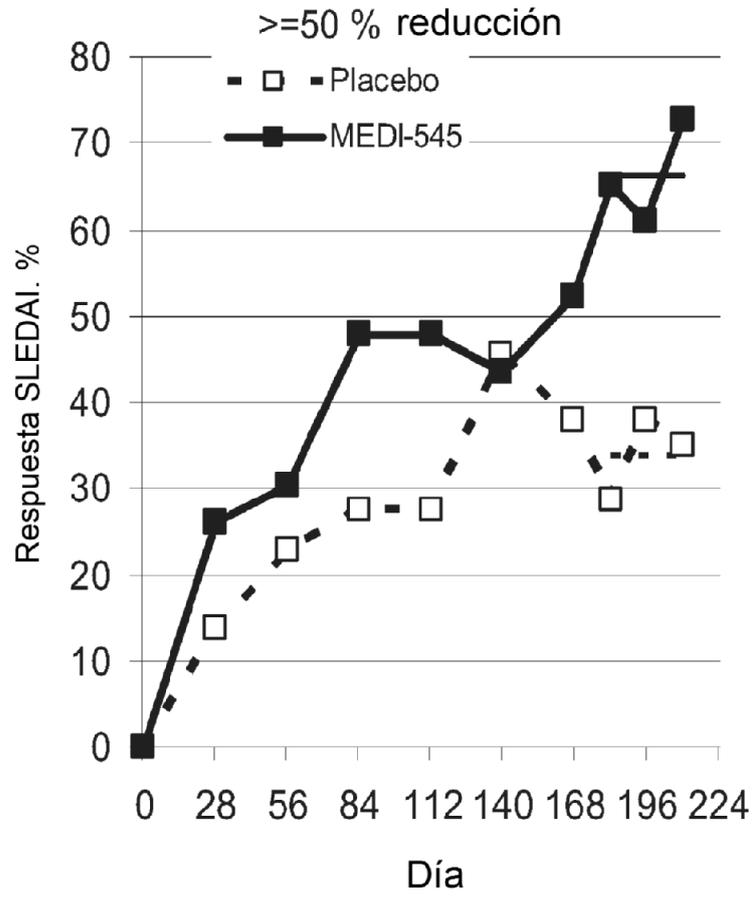


Figura 5 A

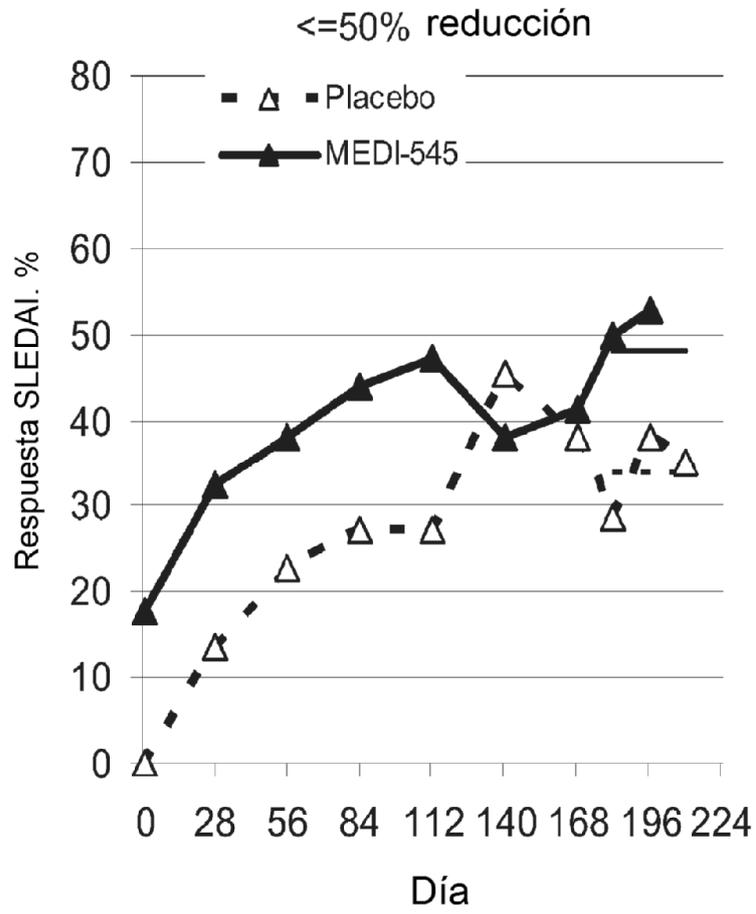


Figura 5 B

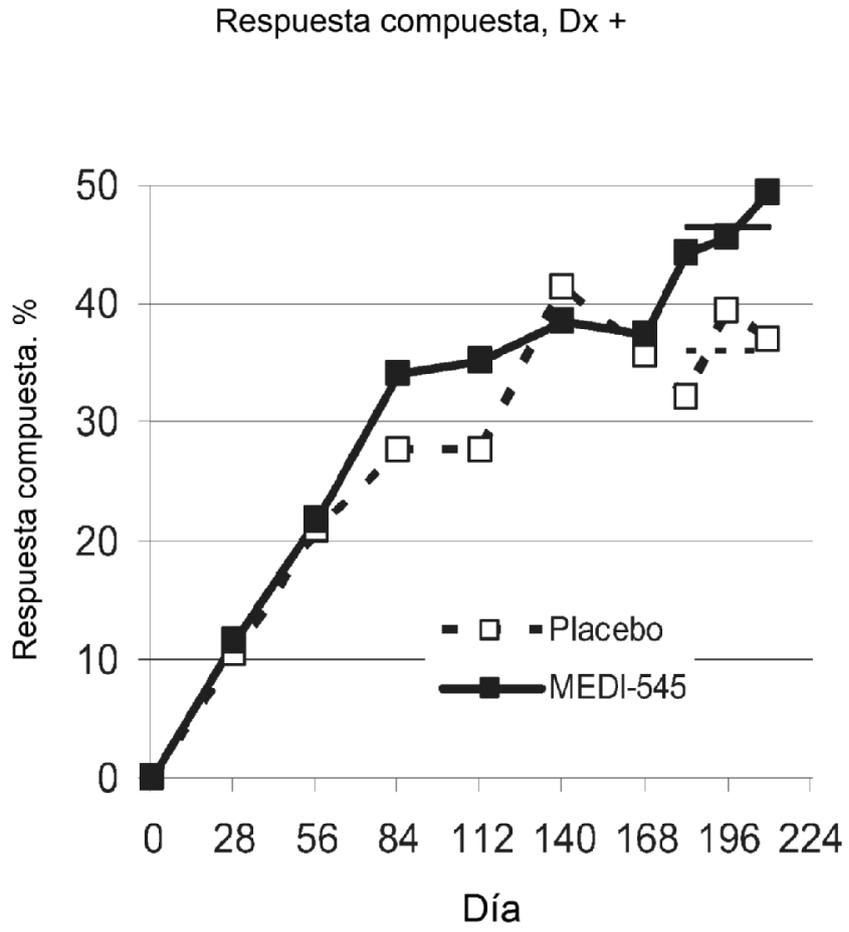


Figura 6 A

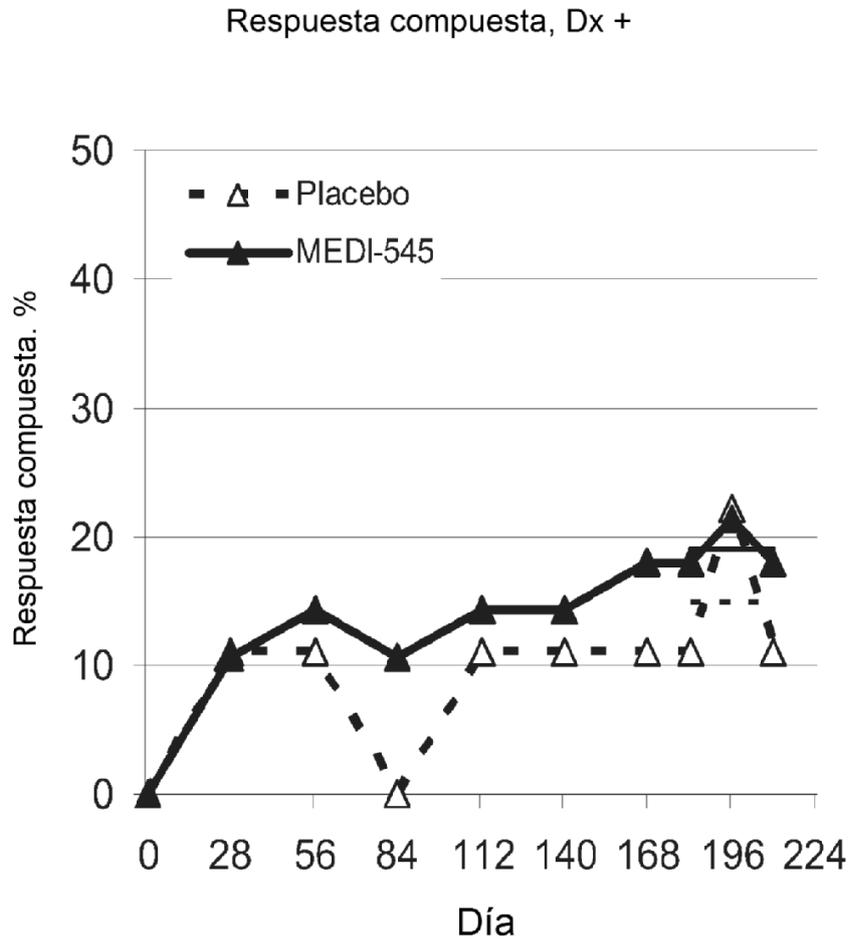


Figura 6 B

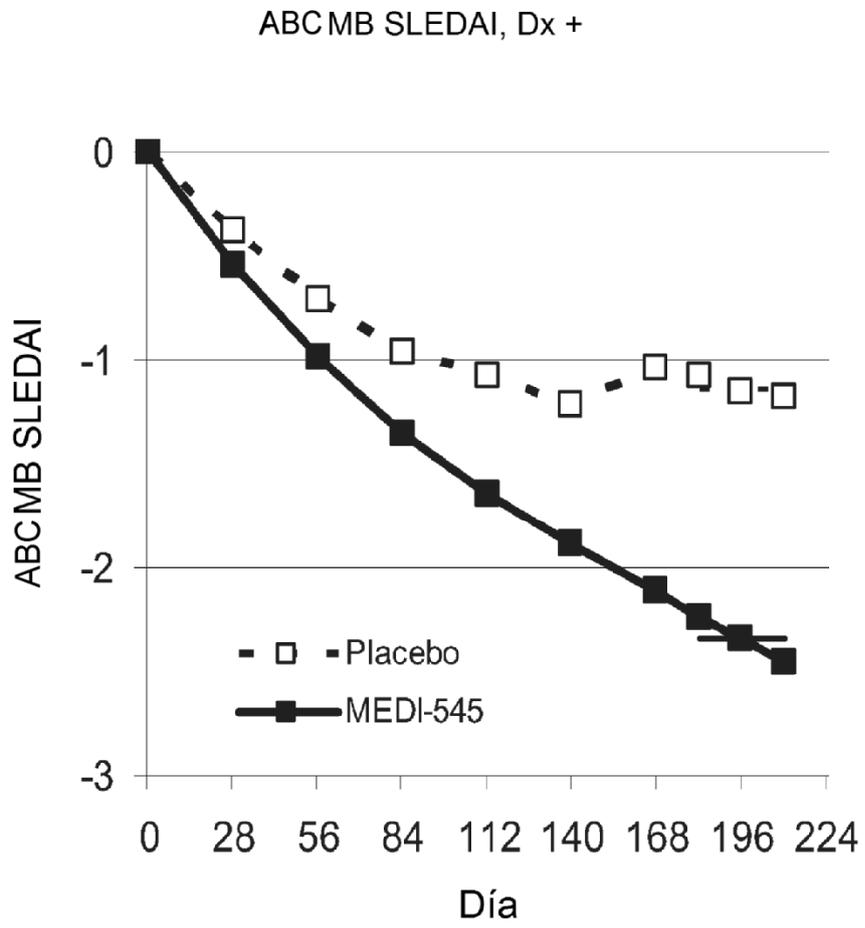


Figura 7 A

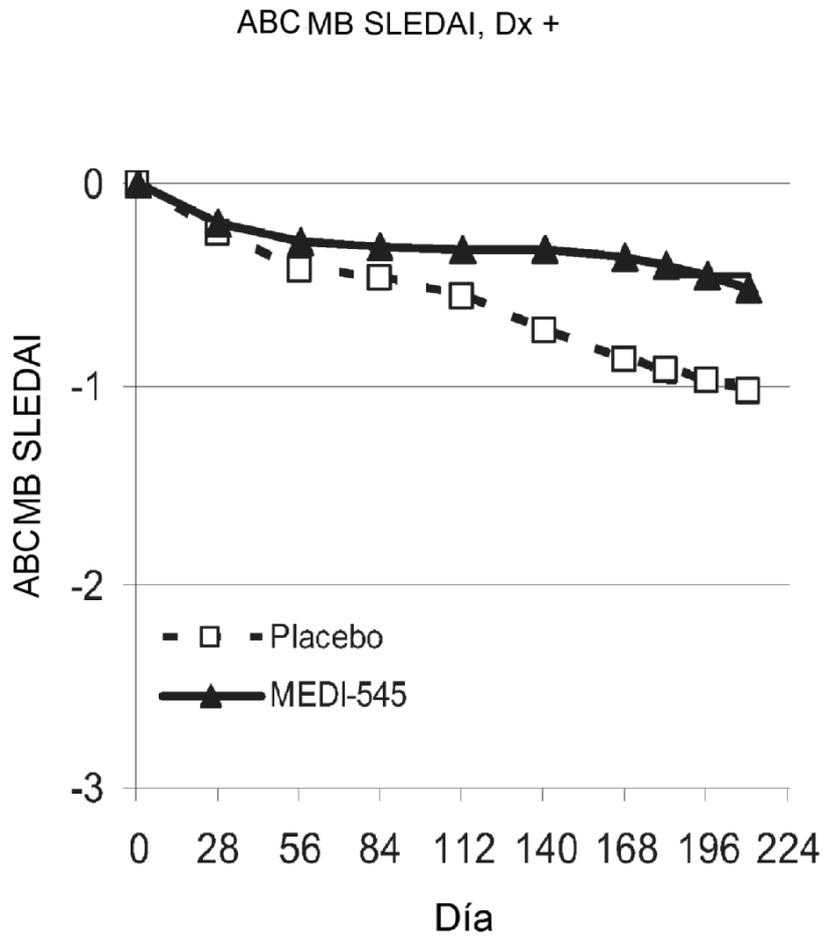


Figura 7 B

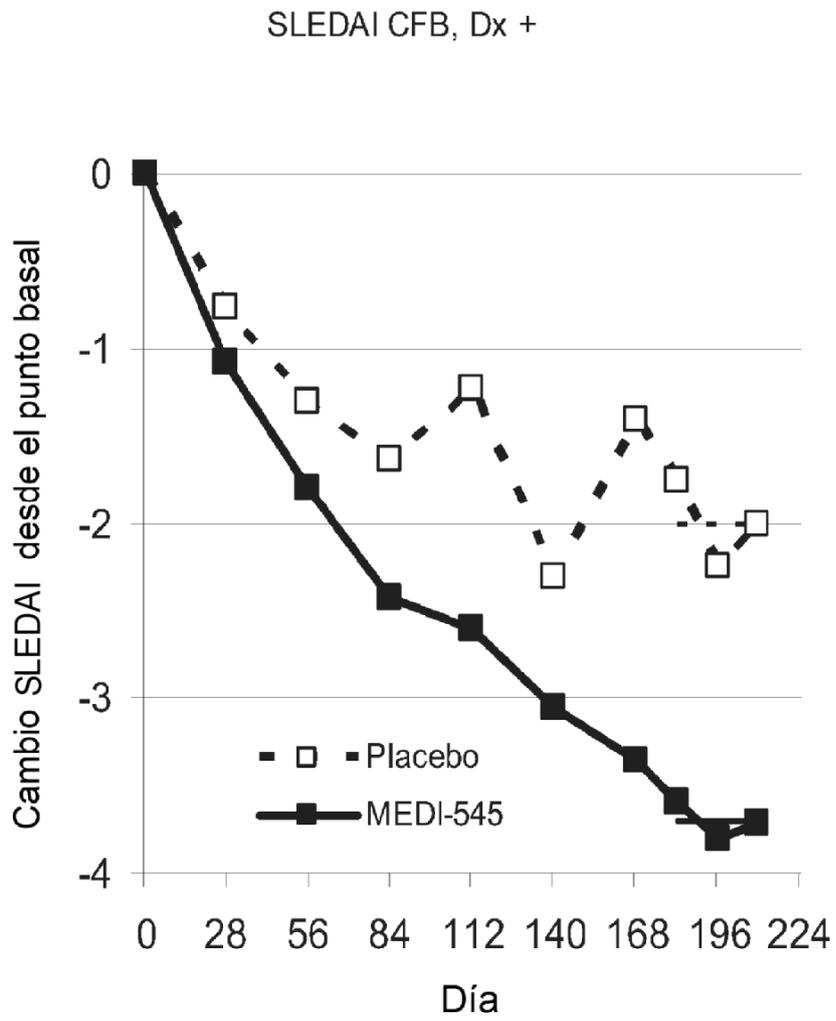


Figura 8 A

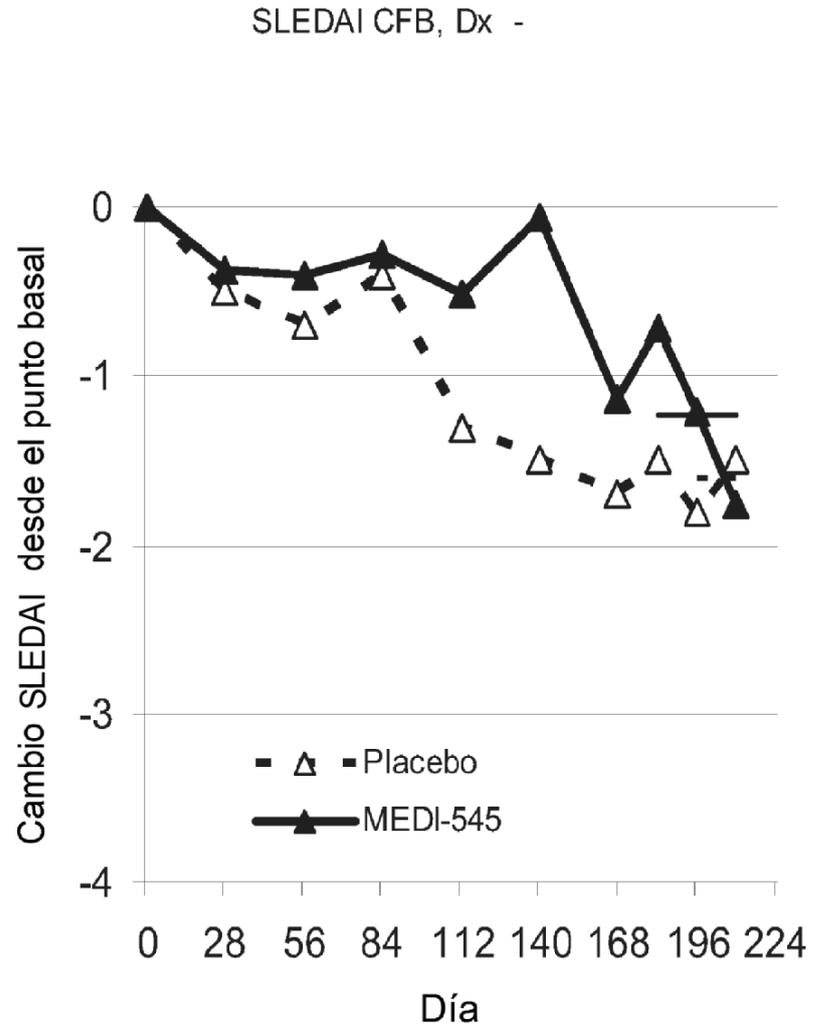


Figura 8 B

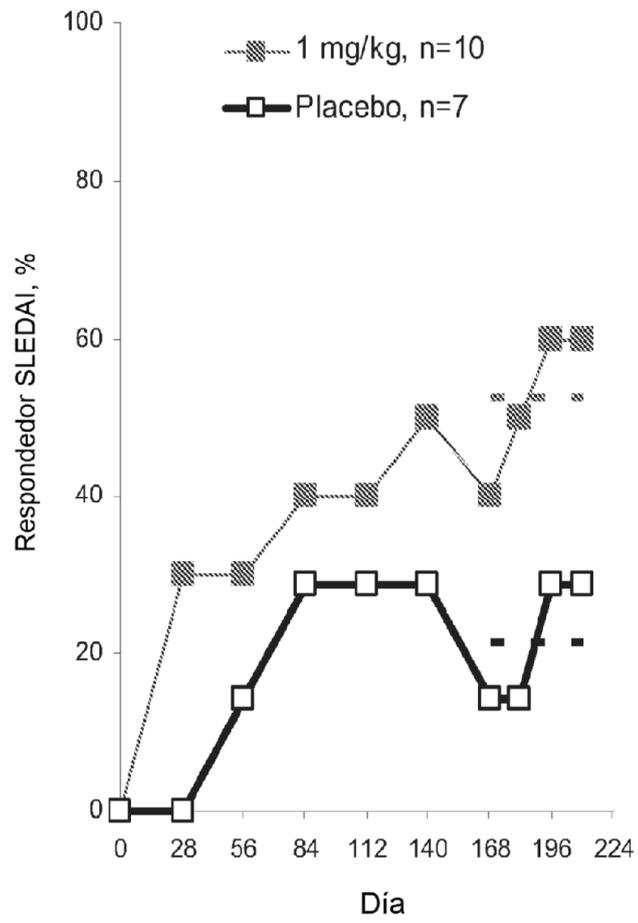


Figura 9 A

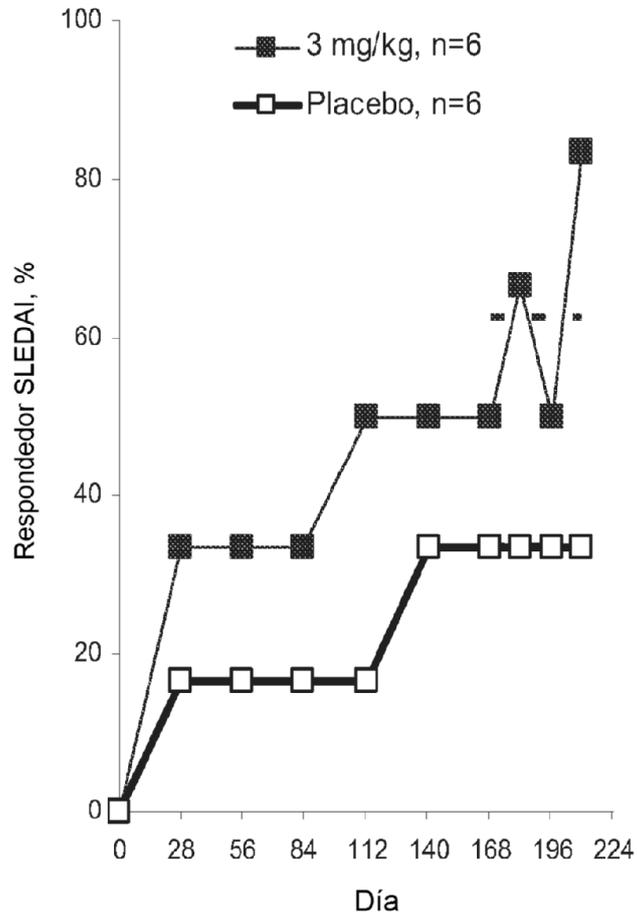


Figura 9 B

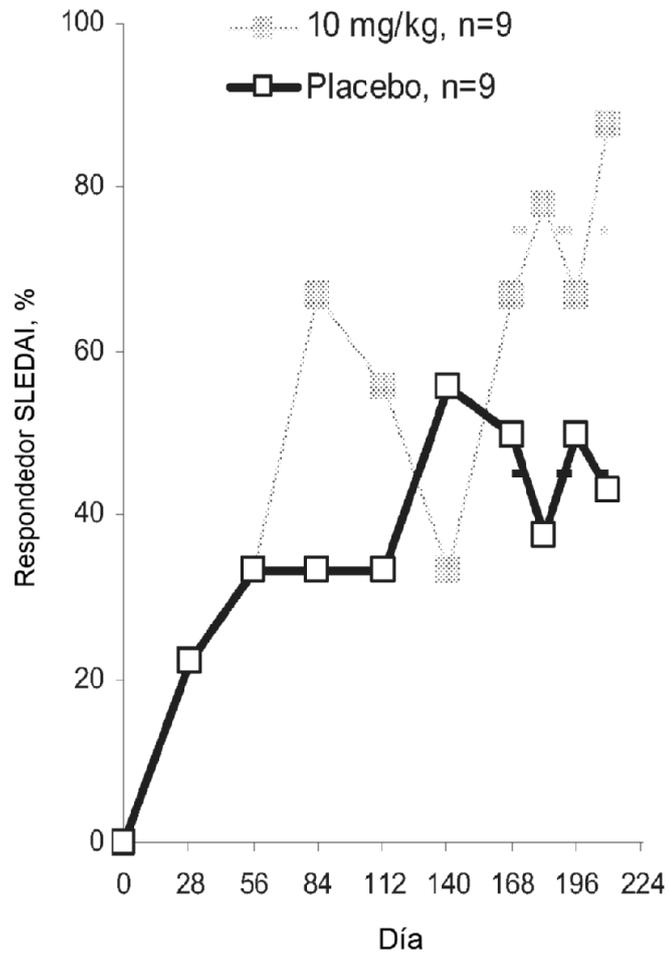


Figura 9 C

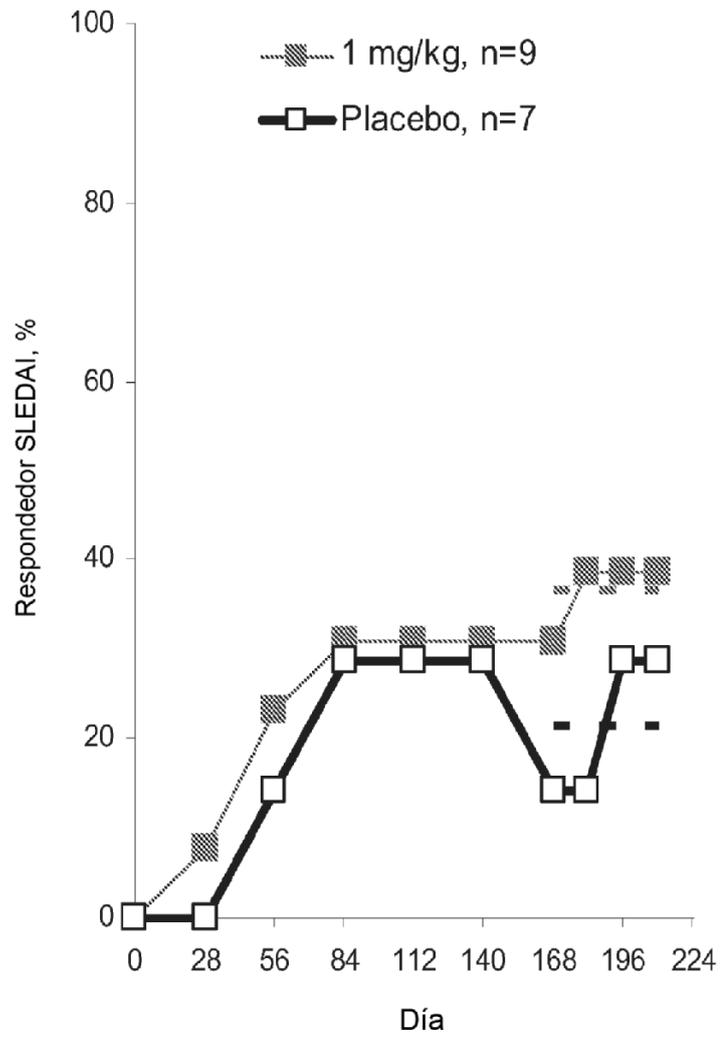


Figura 10 A

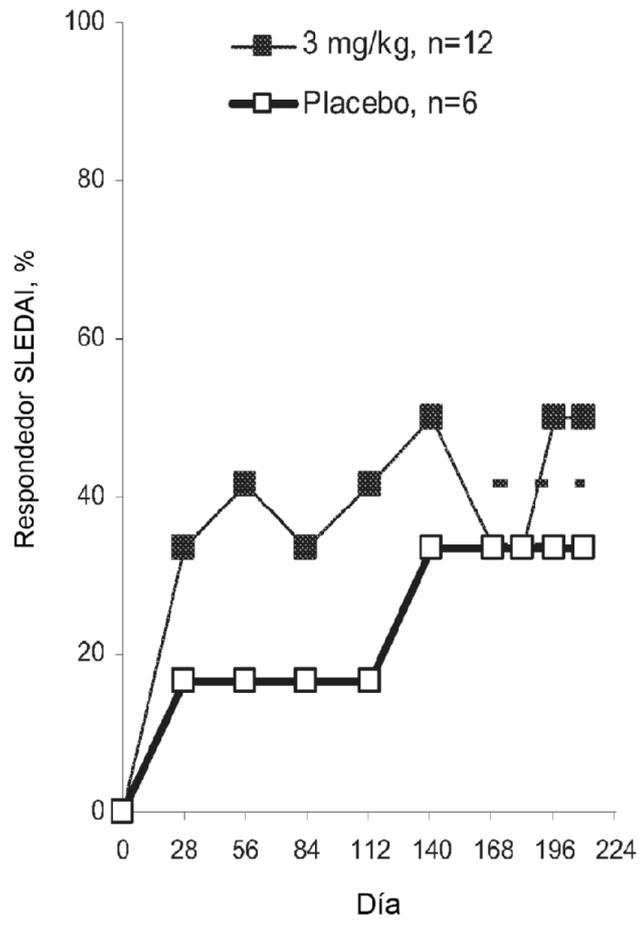


Figura 10 B

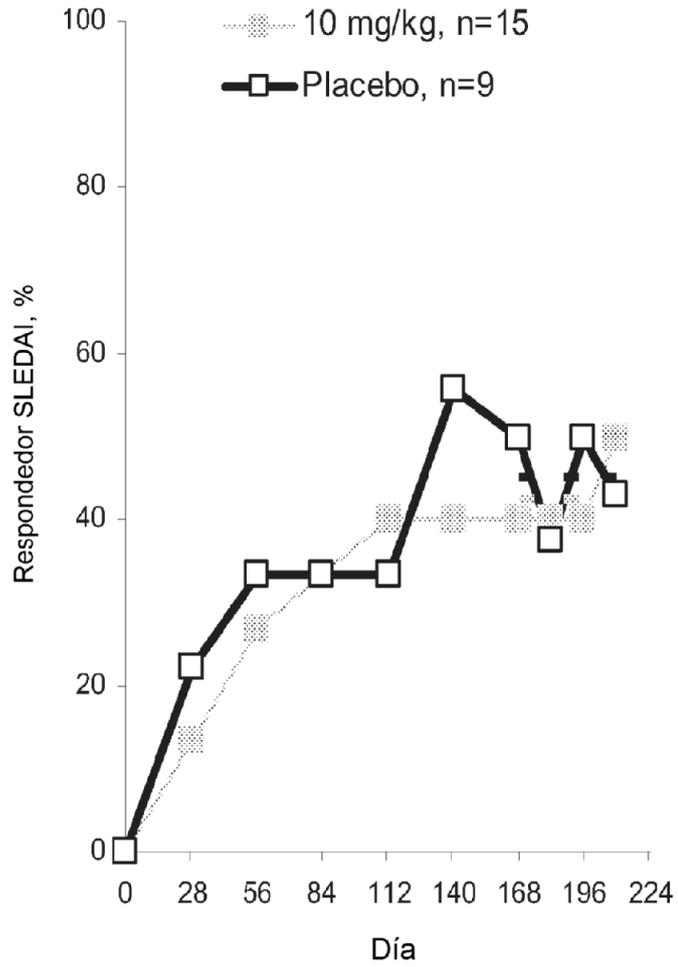


Figura 10 C

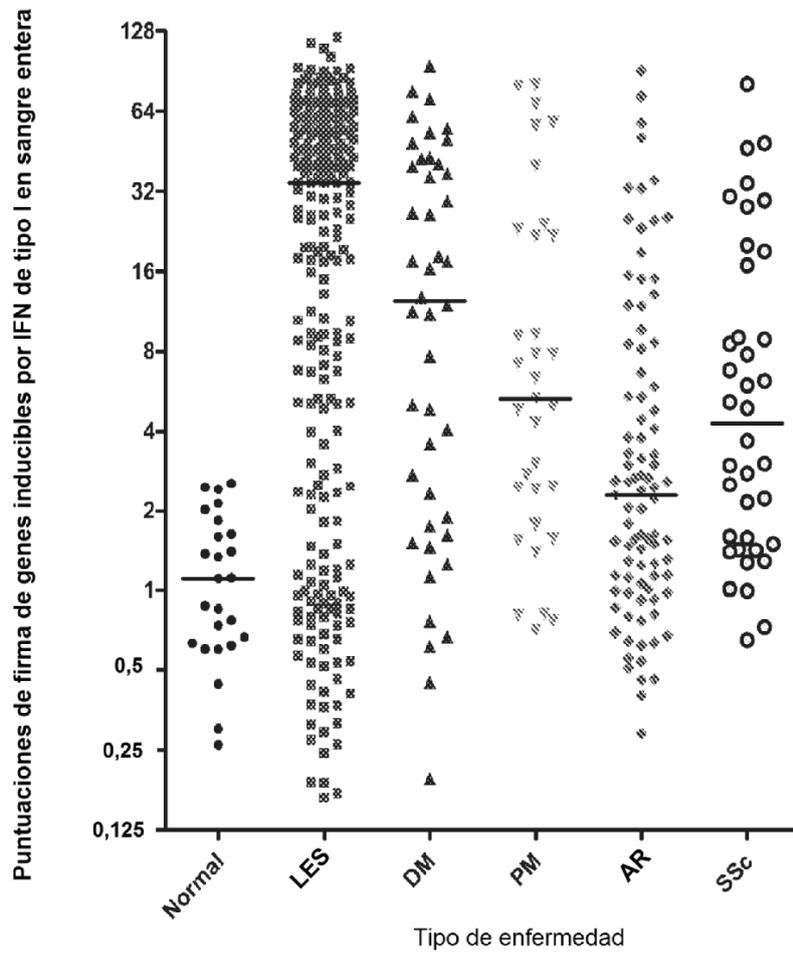


Figura 11 A

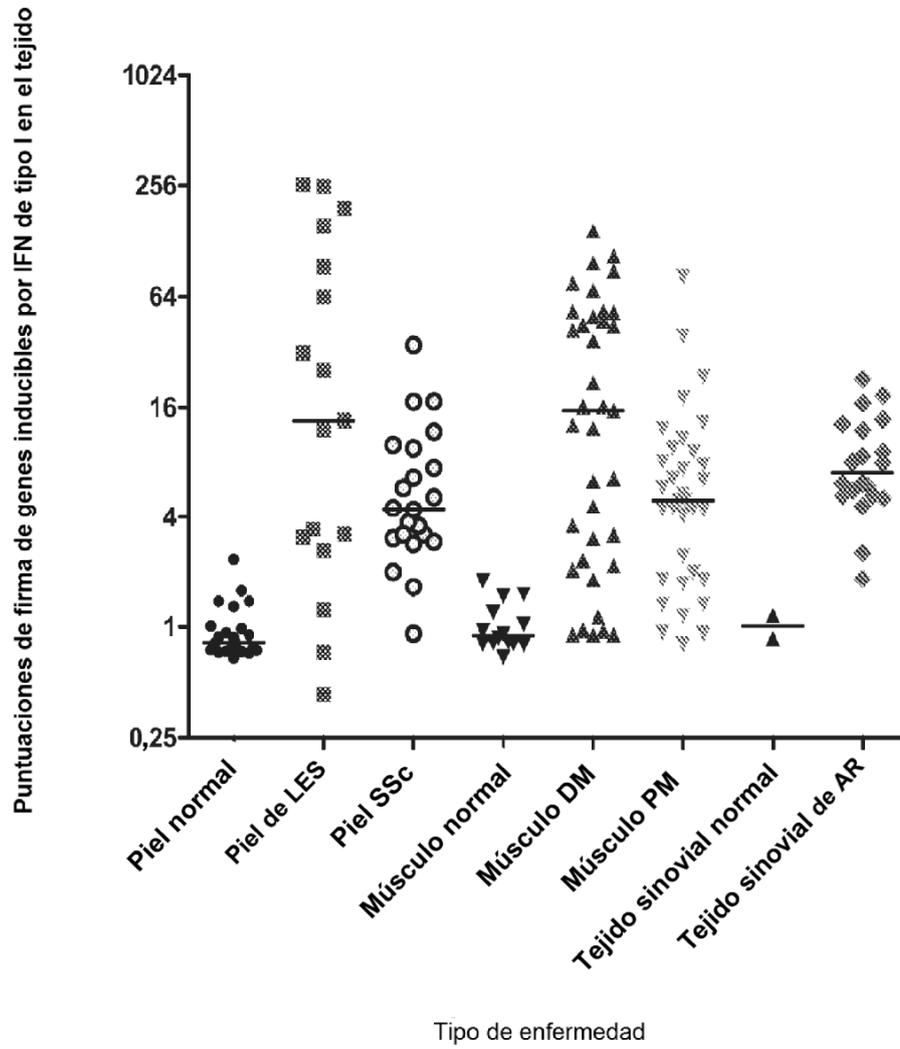


Figura 11 B

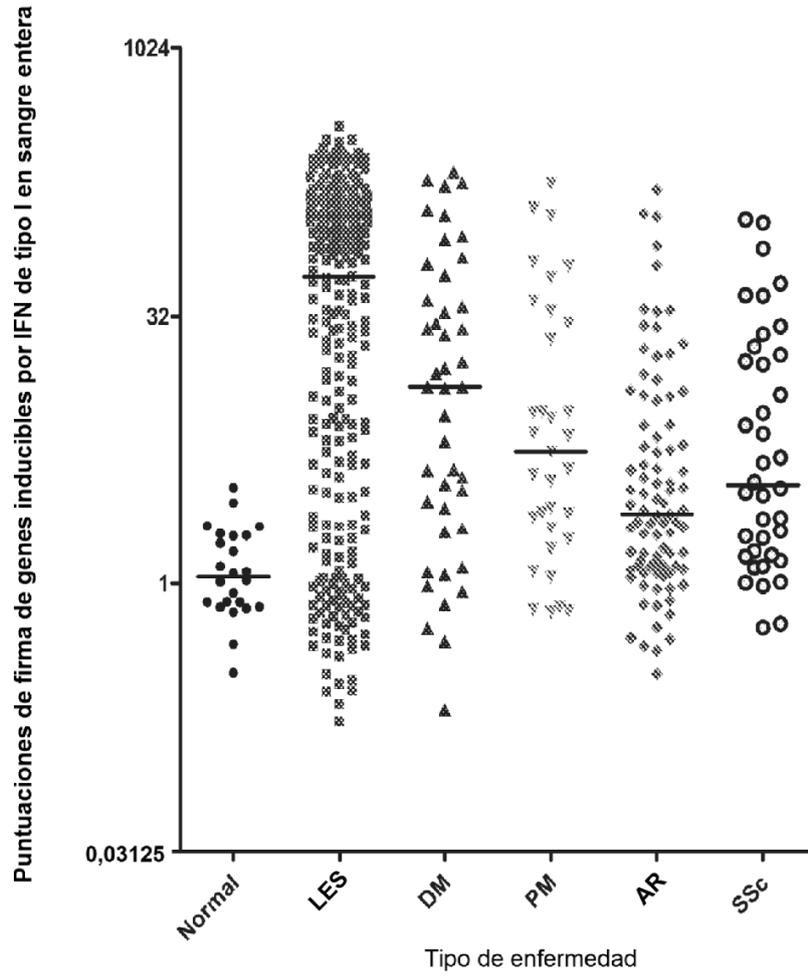


Figura 12 A

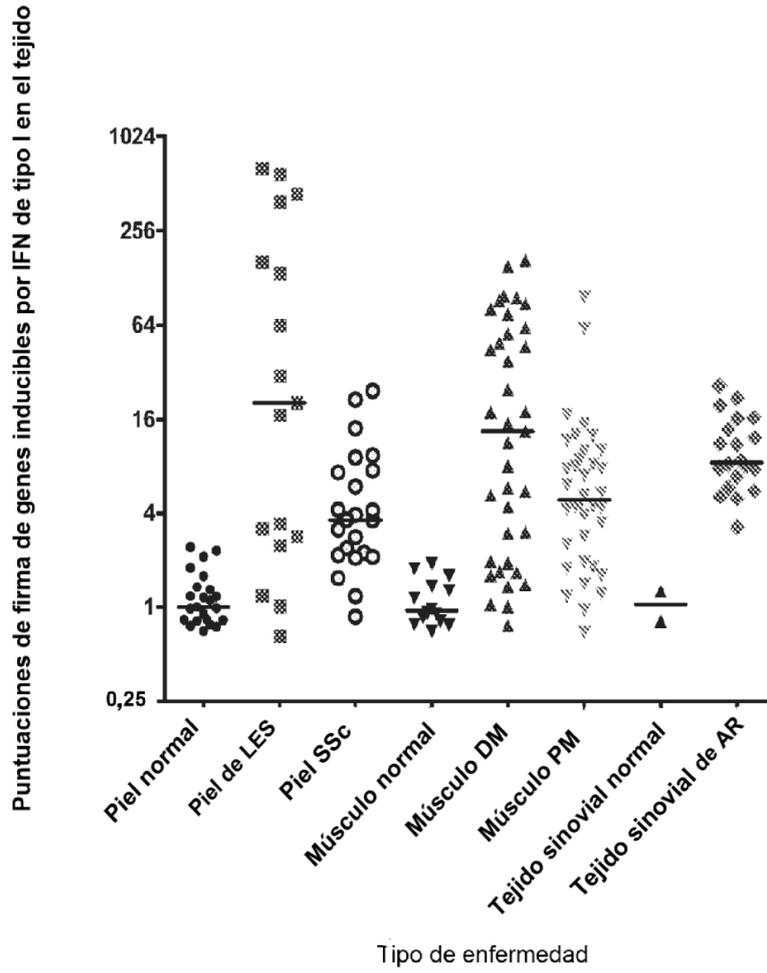


Figura 12 B