

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 972**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.10.2013 PCT/HU2013/000101**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.04.2014 WO14060785**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2013 E 13789899 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2909340**

54 Título: **Método de diagnóstico para predecir la respuesta a un inhibidor de TNF alfa**

30 Prioridad:

19.10.2012 HU P1200607

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

11.12.2017

73 Titular/es:

**EGIS GYÓGYSZERGYÁR ZRT. (100.0%)
Keresztúri út 30-38
1106 Budapest, HU**

72 Inventor/es:

**NAGY, LÁSZLÓ;
MESKÓ, BERTALAN;
STEINER, LÁSZLÓ;
ZAHUCZKY, GÁBOR y
HOLLÓ, ZSOLT**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 645 972 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

Método de diagnóstico para predecir la respuesta a un inhibidor de TNF alfa

Campo de la invención

5 La invención se sitúa en el campo de métodos de diagnóstico. Se desvelan nuevos métodos *in vitro* para predecir si un paciente respondería a un tratamiento con un inhibidor de TNF α .

Antecedentes de la invención

10 El factor de necrosis tumoral (TNF) promueve la respuesta inflamatoria, lo que a su vez provoca muchos de los problemas clínicos asociados con trastornos autoinmunitarios, tales como artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, psoriasis, hidradenitis supurativa y asma refractaria. Estos trastornos se tratan algunas veces usando un inhibidor de TNF.

15 Se considera que la artritis reumatoide (AR) es un trastorno autoinmunitario inflamatorio sistémico crónico que puede afectar a muchos tejidos y órganos, pero que ataca principalmente a las articulaciones flexibles. La AR es una afección dolorosa y habitualmente incapacitante que puede conducir a la pérdida de movilidad. Mientras que la enfermedad de Crohn es un tipo de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) que puede afectar a cualquier parte del tracto gastrointestinal desde la boca hasta el ano, provocando una amplia diversidad de síntomas. Esa provoca principalmente dolor abdominal, diarrea, vómitos o pérdida de peso, pero también puede provocar complicaciones fuera del tracto gastrointestinal.

20 Los tratamientos disponibles en la actualidad para las enfermedades anteriores se basan en poblaciones de pacientes en su conjunto. Como resultado, los tratamientos conocidos pueden hacer que algunos pacientes efectúen ciclos de tratamientos ineficaces antes de identificar una terapia eficaz. Por tanto, existe una necesidad de un medicamento personalizado para tratar mejor enfermedades relacionadas con TNF alfa (por ejemplo AR o EII) y identificar opciones de tratamiento eficaces para un paciente dado.

25 El documento EP 1857 559 desvela un método *in vitro* para predecir si un paciente respondería a un tratamiento con un agente de bloqueo de TNF α , método que comprende determinar el nivel de expresión de ocho genes en una muestra biológica del paciente, en el que dichos genes son EPS15, HLA-DPB1, AKAP9, RASGRP3, MTCBP-1, PTNP12, MRPL22 y RPS28.

30 El documento WO 2011/097301 desvela un método de predicción de la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene artritis reumatoide (AR) al tratamiento con un inhibidor de TNF α , comprendiendo el método determinar la presencia de un alelo de epítipo compartido de HLA-DRB 1 (HLA-DRB 1 SE) en una muestra del sujeto, en el que la presencia de al menos una copia del alelo HLA-DRB1 SE indica que el sujeto responderá al tratamiento con el inhibidor de TNF α .

35 A pesar del hecho de que los documentos WO 2011/097301 y EP 1857 559 desvelan métodos para predecir la capacidad de respuesta a tratamiento con un inhibidor de TNF-alfa, sigue existiendo la necesidad de métodos adicionales más eficaces y precisos para determinar si un paciente que tiene una enfermedad relacionada con TNF alfa respondería a diversas opciones de tratamiento.

Breve descripción de la invención

40 Hasta el final de 2010, más de 2.000.000 de pacientes en todo el mundo han recibido tratamiento con agentes biológicos anti TNF- α , tales como infliximab, adalimumab y etanercept, en afecciones tales como artritis reumatoide (AR) o enfermedad de Crohn (EC) entre otras, pero las eficacias de estos son diferentes (M.P. Karampetsou et al., QJM (2010) 103 (12): 917-928.).

45 El problema básico de la terapia con anticuerpo monoclonal (AMC) en enfermedades inflamatorias crónicas puede resumirse mediante las conclusiones de dos publicaciones recientes. 1) Un porcentaje significativo, aproximadamente un 30% de pacientes con AR no responden a la terapia biológica (Van Baarsen et al., Genes and Immunity 11,622-629). 2) Los resultados de diversos estudios a gran escala que se centran en el uso de terapias biológicas en enfermedades autoinmunes también indican que la eficacia puede disminuir tras un ciclo para un segundo inhibidor de TNF (Rubbert-Roth et al., Arthritis Research & Therapy 2009).

Por lo tanto, predecir si el paciente respondería a la terapia antes de la primera o segunda opción terapéutica es una necesidad insatisfecha en el ámbito clínico y tendría un gran efecto sobre el uso de estos medicamentos al hacer el tratamiento más rentable y proporcionar a los pacientes la oportunidad de recibir una terapia personalizada.

50 El método de la invención está basado en el uso de un algoritmo basado en bioinformática para identificar conjuntos de genes, los perfiles de expresión combinados de los cuales permiten distinguir entre pacientes que responden y pacientes que no responden a un tratamiento con un inhibidor de TNF α .

Más específicamente, para resolver el problema anterior, los presentes inventores han desarrollado un método in

5 vitro para predecir si un paciente respondería a un tratamiento con un inhibidor de TNF α , como se define en las reivindicaciones 1 a 7 adjuntas. Adicionalmente, en el presente documento se desvela un método que comprende determinar el nivel de expresión de al menos 6 genes seleccionados entre los genes ABCC4, AIDA, ARHGEF12, BMP6, BTN3A2, CA2, CADM2, CD300E, CYP1B1, ENDOD1, FCGR1A, FMN1, GCLC, GPR34, HORMAD1, IGF2BP2, IL18R1, IL1RL1, KAT2B, MAP1LC3B, MMD, MS4A4A, MS4A7, ODC1, PBX1, PCYT1B, PIP4K2A, PIP5K1B, PRDM1, PSME4, RAD23A, RIOK3, RNASE2, RNF11, SLC7A5, THEM5, TMEM176A, TMEM176B, UBE2H, WARS o entre APOBEC3A, AQP9, CCL4, CNTNAP3, CYP4F3, DHRS9, EIF2AK2, ELOVL7, EPST11, FCGR3A, GPAM, GPR15, GZMB, IFI35, IFI44, IFI44L, IFI6, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFITM1, IL2RB, IRF2, IRF7, MGAM, MICA, MME, MX1, OR2A9P, PF4, PTGS2, RAVER2, RFC1, RGS1, RSAD2, S100P, SERPINB10, SERPING1, SIGLEC1, TNF, TNFAIP6 en una muestra biológica de dicho paciente. De acuerdo con una realización preferida, los niveles de expresión relativos de los genes seleccionados se determinan en comparación a un gen constitutivo. Preferiblemente, dicho gen constitutivo es ciclofilina, más preferiblemente Ciclofilina A (PPIA). En los métodos de la invención, la muestra biológica es sangre periférica, más preferiblemente el nivel de expresión se determina en células mononucleares de sangre periférica (CMSP).

15 De acuerdo con un primer aspecto preferido de la divulgación, se determinan en dicha muestra biológica el nivel de expresión de los genes ELOVL7, IFI44L, IFIT1, IFIT3, MICA, OR2A9P y RAVER2; o el nivel de expresión de los genes APOBEC3A, IFI44, IFI44L, IFIT1, IFITM1, MICA y RGS1; o el nivel de expresión de los genes APOBEC3A, DHRS9, IFI35, IFI44, IFI44L, MICA y RFC1, preferiblemente en un paciente que padece de artritis reumatoide.

20 De acuerdo con un segundo aspecto preferido de la divulgación, se determinan en dicha muestra biológica el nivel de expresión de los genes BMP6, CD300E, CYP1B1, ODC1, RNF11 y UBE2H; o el nivel de expresión de los genes ARHGEF12, CADM2, CD300E, GCLC, RIOK3 y UBE2H; o el nivel de expresión de los genes CADM2, CD300E, CYP1B1, MMD, ODC1, RNF11 y UBE2H, preferiblemente en un paciente que padece de una enfermedad inflamatoria intestinal p.ej. enfermedad de Crohn.

25 De acuerdo con un tercer aspecto preferido, el método se realiza para seguir la eficacia de dicho tratamiento con un inhibidor de TNF α .

30 De acuerdo con una realización preferida de la invención, dicho inhibidor de TNF α es un anticuerpo anti-TNF α , una proteína de fusión de TNF o una proteína de unión a TNF recombinante, más preferiblemente dicho inhibidor de TNF α es Adalimumab, Certolizumab pegol, Etanercept, Golimumab, Infliximab, Pegsunercept o cualquier versión biosimilar de los mismos, incluso más preferiblemente, dicho inhibidor de TNF α es Infliximab o cualquier versión biosimilar del mismo.

En otro aspecto, el método de la invención comprende adicionalmente la etapa de comparar el nivel de expresión de los genes anteriores con valores de referencia obtenidos de grupos de pacientes que responden y que no responden.

35 Preferiblemente, en el método de la invención, el nivel de expresión se determina cuantificando el nivel de ARNm de dichos genes en la muestra biológica. La tecnología del chip de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-QPCR) son particularmente útiles para determinar el nivel de expresión de dichos genes.

40 De acuerdo con una realización preferida adicional de la invención, el método comprende además la etapa de determinar el nivel de una proteína biomarcadora. Preferiblemente, dicha proteína biomarcadora es una citocina proinflamatoria, quimiocina o un anticuerpo antifármaco.

Adicionalmente, la invención se refiere a un inhibidor de TNF α para su uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con TNF α , en el que el paciente tratado se clasifica como respondedor a un tratamiento con un inhibidor de TNF α mediante el método de la invención, preferiblemente dicho inhibidor de TNF α es Adalimumab, Certolizumab pegol, Etanercept, Golimumab, Infliximab o Pegsunercept.

45 **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1: Cronología y diseño del estudio de la invención.

Figura 2: Ruta esquemática de la generación automática de paneles génicos.

50 Figura 3: Niveles normalizados de ARNm de genes significativamente cambiantes en grupos de pacientes con artritis reumatoide (AR) antes y después de la terapia (valores p para AQP9: 0,02, TNFAIP6: 0,028, IGJ: 0,012). Los datos se calcularon basándose en mediciones de micromatrices.

Figura 4: Niveles de ARNm normalizados de los 4 genes que se encontró que cambiaban de una manera estadísticamente significativa con respecto a NR (No respondedores) frente a R (Respondedores) en comparación con la AR.

Figura 5: Niveles normalizados de ARNm de genes significativamente cambiantes en grupos de pacientes con

enfermedad de Crohn (EC) antes y después de la terapia (valores p para MMP8: 0,018, AQP9: 0,011, IGKC: 0,001, TNFAIP6: 0,005, MGAM: 0,011). Los datos se calcularon basándose en mediciones de micromatrices.

Figura 6: Niveles de ARNm normalizados de los 4 genes que se encontró que cambiaban de una manera estadísticamente significativa con respecto a NR frente a R en comparación con la EC.

5 Figura 7: Listas de tres genes puntuados mediante análisis discriminante lineal (ADL) en artritis reumatoide (AR). Las barras de la izquierda representan no respondedores, las barras de la derecha representan respondedores. Cuanto más grande es la distancia entre los grupos y más pequeño es el solapamiento entre las muestras, mayor es el poder de separación de la lista genética. El panel génico del experimento de micromatrices (cohorte de ensayo) está a la izquierda, el panel génico de los experimentos de RT-QPCR (cohorte de validación) está a la derecha para cada panel génico, y una lista de genes con los valores p más altos sirviendo como un control negativo basado en los datos de micromatrices está a la derecha.

15 Figura 8: Listas de tres genes puntuados mediante análisis discriminante lineal (ADL) en enfermedad de Crohn (EC). Las barras de la izquierda representan no respondedores, las barras de la derecha representan respondedores. Cuanto más grande es la distancia entre los grupos y más pequeño es el solapamiento entre las muestras, mayor es el poder de separación de la lista genética. El panel génico del experimento de micromatrices (cohorte de ensayo) está a la izquierda, el panel génico de los experimentos de RT-QPCR (cohorte de validación) está a la derecha para cada panel génico, y una lista de genes con los valores p más altos sirviendo como un control negativo basado en los datos de micromatrices está a la derecha.

20 Figura 9: Correlación entre el número de genes en cada panel génico y el valor de F mínimo calculado para dicho panel tanto en la cohorte de ensayo como en la de validación en AR.

Figura 10: Correlación entre el número de genes en cada panel génico y el valor de F mínimo calculado para dicho panel tanto en la cohorte de ensayo como en la de validación en EC.

Figura 11: Niveles de IFN γ medidos mediante ELISA en EC (cohorte de ensayo)

Figura 12: Niveles de IL-6 medidos mediante ELISA en EC (cohorte de ensayo)

25 Figura 13: Diagramas de dispersión de citocinas séricas que muestran diferencias significativas en AR (cohorte de ensayo)

Figura 14: Niveles de TNF α medidos mediante ELISA en muestras de AR basales desde la cohorte de ensayo

Figura 15: Niveles de TNF α medidos mediante ELISA en muestras de AR a la semana 2 desde la cohorte de ensayo

30 Figura 16: Niveles de TNF α medidos mediante ELISA en muestras de AR basales y a la semana 2 desde la cohorte de ensayo

Figura 17: Niveles de Infliximab medidos mediante ELISA en pacientes con AR a la semana 2 y 14 (cohorte de ensayo).

35 Figura 18: Niveles de Infliximab a la semana 2 en pacientes con EC medidos mediante ELISA (cohorte de ensayo)

Figura 19: Niveles de Infliximab a la semana 2 en pacientes con AR medidos mediante ELISA (cohorte de ensayo).

Descripción detallada de la invención

40 El perfil de expresión génica global en sangre periférica es una tecnología probada en la descripción del nivel de fondo patogénico de trastornos autoinmunitarios y la estratificación de las enfermedades. La sangre periférica es una fuente accesible de material biológico, incluyendo células, y tiene ventajas evidentes para su uso en procesos de cribado. Adicionalmente, como las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) circulantes son células clave de la inflamación; varios grupos de investigación examinaron las CMSP en experimentos de micromatrices. Los patrones de expresión génica en monocitos circulantes, células T y células B, puede reflejar los mecanismos de la enfermedad, pero no necesariamente, lo que significa que es un reto extender los marcadores farmacogenómicos a ensayos de diagnóstico multigénicos basados en paneles génicos que predicen la respuesta a terapias o la evolución de la enfermedad. El perfil de expresión génica de CMSP proporciona una alternativa menos cara y menos invasiva a la biopsia u otros métodos invasivos. Sin embargo, aún no se ha realizado, hasta ahora, la comparación de patrones de expresión génica de diferentes enfermedades autoinmunes centrándose en una terapia específica.

50 Los biomarcadores o conjuntos de biomarcadores combinados que predicen la respuesta a la terapia se usan ahora de una manera habitual para mejorar la especificidad del tratamiento. Utilizar el muestreo de sangre periférica menos invasivo también tiene ventajas evidentes. Aunque las limitaciones incluyen la dificultad del muestreo con respecto al

procesamiento de las muestras en el laboratorio, y para minimizar la heterogeneidad de las muestras, deben seguirse directrices estrictas tanto por los facultativos que recolectan como para los investigadores que procesan las muestras.

5 Los presentes inventores determinaron paneles génicos con la mayor potencia discriminadora a través del perfil génico de sangre periférica global en una cohorte de pacientes de ensayo y validaron los resultados sobre una cohorte de pacientes independiente.

10 En resumen, el método de la invención en un aspecto puede resumirse de la siguiente manera. Se recoge sangre periférica de pacientes con AR y opcionalmente se separan de las CMSP. Desde la sangre periférica o las CMSP aisladas el ARN se aísla y después se transcribe inversamente a ADNc. Para la determinación de niveles de expresión relativos de los genes seleccionados de acuerdo con la invención se usa simultáneamente el método RT-QPCR.

15 El enfoque seguido por los presentes inventores fue realizar un análisis de expresión génica global en una cohorte de ensayo con tecnología de micromatrices Affymetrix para identificar una lista de genes que podrían validarse en una cohorte independiente con un método de qPCR más sensible en tiempo real (RT). La tecnología RT-QPCR es la herramienta más robusta para mediciones de expresión génica (en términos de sensibilidad, intervalo dinámico, estandarización, rendimiento y precio) que también la hace ideal como herramienta de diagnóstico.

20 Sin embargo, los inventores suponen que no solo datos basales, si no que los datos usados a la semana 2 podrían usarse para la validación. Por tanto, los genes que determinan el estatus de respondedor de una manera estadísticamente significativa a la semana 2 también se añadieron al conjunto génico de validación; así como unos pocos genes de la bibliografía relevante.

25 Con respecto a las comparaciones de las muestras basales y a la semana 2 mediante micromatriz en ambas condiciones, los efectos de la terapia en sí misma se han representado mediante 5 genes en EC, fuera de los cuales se identificaron anteriormente AQP9 y TNFAIP6 como marcadores de EII en los niveles de expresión genética; se encontró que MGAM es un factor predictivo de asociación de genoma completo de respuesta a terapia de bloqueo de TNF α en EII pediátrica, mientras que se ha demostrado la expresión de MMP8 en el área activamente inflamada en la base ulcerosa de muestras colónicas en EII, y su presencia en el estroma sugiere una etiología de EII. En la AR, cada uno de los genes que se descubrieron que cambiaban significativamente en las primeras dos semanas de terapia es relevante para su patogénesis: AQP9 y TNFAIP6 discriminaban pacientes con AR de controles sanos a través del perfil de expresión génica de CMSP; y la IGJ (inmunoglobulina J) mostraba una expresión de ARNm significativamente mayor en gemelos con AR comparados con sus co-gemelos sanos.

35 La validación por RT-QPCR en una cohorte independiente también daba como resultado una lista de genes con diferencias significativas entre respondedores y no respondedores. En la EC, estos genes incluyen TMEM176B y TMEM176A que se consideran blancos de la función de las células dendríticas al formar multímeros y restringir la maduración de las células dendríticas; UBE2H con respecto al cual TNF- α es un regulador conocido de la actividad de conjugación de ubiquitina dependiente de UBE2H; y WARS, una triptofanil-ARNt sintetasa. En la AR, se descubrió que eran significativos CYP4F3 que está asociado con los patomecanismos de la osteoartritis; DHRS9, MGAM; y PF4 se detectó como un factor predictivo de no respuesta para infliximab en AR en un estudio proteómico.

40 Aunque genes individuales podrían mostrar diferencias significativas entre respondedores y no respondedores, las diferencias subyacentes que determinan una potencia de predicción mayor pueden detectarse únicamente analizando los paneles génicos.

Para identificar paneles génicos con el mayor poder discriminador se usó el análisis de variables canónicas (AVC) o el análisis discriminante lineal (ADL), porque si se compara con el análisis univariable que puede ignorar las interacciones potenciales entre genes, puede revelar las diferencias subyacentes mediante el uso simultáneo de genes como un panel génico que proporciona una segregación perfecta en el espacio multidimensional.

45 Se sabe que los conjuntos de paneles génicos relacionados con los resultados, identificados por estudios de expresión génica similares tenían únicamente unos pocos genes en común que podrían atribuirse a los diferentes métodos de preparación de la muestra, extracción de ARNm o análisis de los datos y, así como las variaciones individuales y heterogenicidades asociadas con los marcadores, incluso en una cohorte clínicamente homogénea de pacientes. Que se incluyan en la lista de genes con diferencias estadísticamente significativas entre respondedores y no respondedores no indica necesariamente la importancia del gen en la patogenética de la enfermedad o terapia, por lo que debe analizarse la lista completa de genes relacionados con la respuesta para detectar los blancos potenciales para el tratamiento.

50 Cuando se automatiza la selección de los paneles génicos con un alto poder discriminador entre respondedores y no respondedores tanto en cohortes como en enfermedades mediante la construcción de un algoritmo basado en bioinformática, se obtuvieron aproximadamente 4700 paneles génicos en cada afección con una segregación del 100% con respecto al estatus de respondedor. Entre ellos, se identificaron 3-3 paneles génicos con el más alto poder discriminador considerando los valores F de los paneles, los datos de validación cruzada y los márgenes entre los grupos segregados.

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que

- 1) en enfermedades inflamatorias crónicas, tales como en EC y AR, los perfiles de expresión génica de sangre periférica son adecuados para determinar paneles génicos predictivos, los niveles de expresión de los cuales, si se miden antes de la terapia con infliximab, identifican a los pacientes que son susceptibles a la terapia;
- 2) sorprendentemente, se necesitan paneles génicos totalmente diferentes para la predicción del estatus respondedor en EC y AR, a pesar del hecho de que estas afecciones tienen antecedentes patogenéticos similares; y
- 3) se identificaron varios paneles génicos que muestran una segregación perfecta en la cohorte de ensayo y validación, así como una fuerte segregación en los análisis de validación cruzada.

La toma de muestras es el punto crucial en el método de la invención. Uno de los criterios principales del método aplicado es que debe estabilizar el ARN, haciendo de este modo posible el almacenamiento y la transferencia de muestras. Tales métodos están disponibles en el mercado pero producen poblaciones celulares más o menos diferentes que la que se usó en el estudio (CMSP/Trizol). La toma de muestras también tiene que ser capaz de proporcionar como mínimo 120-140 muestras, que es lo que se necesita para un análisis estadístico adecuado. El procesamiento de muestras, QC y las mediciones de RT-qPCR son tecnologías bien establecidas.

Además del método de toma de muestras CMSP/Trizol descrito, los inventores han probado otros métodos de toma de muestras. Entre estos, el método de muestreo PAXGene (Quiagen Corp., USA) y el LeukoLock (Life Technologies Corp., USA) mostraron una buena correlación con el método CMSP/Trizol. Sin embargo, en la práctica clínica, el método de muestreo preferido sería el método de muestreo PAXGene, puesto que este método requiere menos equipo de laboratorio y menos habilidades de la persona que realiza la toma de muestras.

El conjunto génico de acuerdo con la divulgación que se identificó y validó por los presentes inventores satisface una necesidad insatisfecha de un método genómico que discrimine inequívocamente entre respondedores y no respondedores para una terapia con inhibidor de TNF α (por ejemplo infliximab) tanto en la enfermedad de Crohn (EC) como en artritis reumatoide (AR). El método de diagnóstico de acuerdo con la invención da una oportunidad para introducir por primera vez en este campo una atención médica personalizada que beneficia a todos los pacientes. Adicionalmente, no solo es beneficioso para los pacientes que podrían verse privados de recibir una terapia ineficaz y después pasar a un ciclo de la adecuada, sino también los médicos clínicos, las autoridades reguladoras y compensatorias y los proveedores también obtienen beneficio de la eficacia y seguridad aumentadas de la terapia.

Ejemplos

Diseño del estudio

Se incluyeron 20 pacientes con enfermedad de Crohn (EC) y 19 con artritis reumatoide (AR) en el estudio (muestreo antes y a las 2 semanas después de la terapia) en la **cohorte de ensayo** para experimentos con micromatrices.

Para el proceso de validación, se incluyeron en los experimentos de RT-QPCR muestras de 15 pacientes con AR a la semana 0 **de la cohorte de validación**, 5 pacientes de la cohorte de ensayo (para validación técnica) y de 20 pacientes con EC a la semana 0 **de la cohorte de validación**. El diagrama esquemático de la figura 1 muestra la cronología y el diseño del estudio.

Reclutamiento de pacientes

A) Artritis reumatoide

40 Criterios de inclusión:

- Artritis reumatoide diagnosticada clínicamente (criterios de la American Rheumatism Association de 1987)
- Edad entre 20 y 60
- Falta de respuesta a al menos dos fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad, incluyendo metotrexato
- Enfermedad activa (definida como tener una puntuación de actividad de la enfermedad evaluada en 28 articulaciones (DAS28) >3,2).
- Pacientes no tratados previamente con terapia anti-TNF
- Se permitió el tratamiento con 10 mg por día de prednisona a condición de que la dosis hubiera sido estable durante al menos 2 meses antes de la entrada.
- Se permitieron corticosteroides orales (dosis máxima de 10mg por día - prednisona) y fármacos antiinflamatorios no esteroideos si fueron estables durante al menos 1 mes antes del periodo basal.
- Los pacientes recibieron un tratamiento de metotrexato máximo tolerable (5-30 mg por semana), que tuvo que ser estable durante al menos 4 semanas antes del periodo basal.
- La proporción mujeres:hombres es 3:1

Criterios de exclusión:

fumador o ex fumador; embarazo o lactancia materna; malignidad actual o reciente; comorbilidades clínicamente significativas; enfermedad infecciosa activa; pacientes con antecedentes de una enfermedad articular inflamatoria aguda de diferente origen

5 **Parámetros recogidos:**

Edad, Diagnóstico de la AR (año), DAS28, CRP, We, RF, Co-morbilidades, Fármacos (por ejemplo DMARDS). Después de 14 semanas de tratamiento, la respuesta clínica al tratamiento se evalúa utilizando tanto el criterio EULAR como la reducción de la DAS28 de al menos 1,2.

B) Enfermedad de Crohn

10 **Criterios de inclusión:**

- Enfermedad de Crohn diagnosticada clínicamente
- Edad entre 20 y 60
- CDAI >250
- Nunca en terapia anti-TNF
- 15 • terapia de metotrexato (MTX), pero <20 mg/semana
- terapia de prednisolona, pero <10 mg/día
- La proporción mujeres:hombres es 1:1

Criterios de exclusión:

20 fumador o ex fumador; embarazo o lactancia materna; malignidad actual o reciente; comorbilidades clínicamente significativas; enfermedad infecciosa activa; pacientes con antecedentes de una enfermedad intestinal inflamatoria aguda de diferente origen

Parámetros recogidos:

25 Edad, Diagnóstico de EC (año), CDAI (si CDAI cayó por debajo de 150, los pacientes fueron considerados como respondedores, de lo contrario como no respondedores), CRP, We, comorbilidades, Fármacos, Sinopsis de biopsia de colon (si está disponible), capacidad de respuesta a la semana 14

Toma de muestras del paciente, procesado y almacenaje (CMSP/Trizol)

30 La capacidad de respuesta a la terapia se determinó 14 semanas después de la terapia por los médicos clínicos basándose a los criterios descritos anteriormente. Se tomaron muestras de sangre periférica (10 ml) en tubos para extracción de sangre venosa al vacío que contenían EDTA (BD Vacutainer K2E) para separación de CMSP y 10 ml de sangre periférica en tubos no tratados previamente para la extracción de muestras de suero. Todas las muestras se procesaron una hora después de la toma de muestras.

35 Las CMSP se separaron por centrifugación en gradiente de Ficoll. Brevemente, la sangre periférica se diluyó con 10 ml de una solución salina fisiológica y se estratificó en 10 ml de Ficoll. La centrifugación se realizó a 2500 rpm durante 20 minutos, y después se recogió la capa de las CMSP. Las células se lavaron dos veces con una solución salina (1700 rpm, 7 minutos) y se sometieron a lisis en un reactivo de Trizol y se almacenaron a -70 °C hasta el aislamiento del ARN.

Estadísticas de parámetros clínicos

Se compararon los parámetros clínicos de las cohortes de pacientes usando GraphPad Prism, y se usó la prueba U de Mann-Whitney (un $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo).

40 **Aislamiento de ARN**

El ARN se aisló de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) utilizando el reactivo de Trizol (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se comprobaron la cantidad y la calidad del ARN en un instrumento de fotómetro UV NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) y en un Agilent BioAnalyzer (Agilent Technologies).

Micromatriz

45 Se utilizó la matriz Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0 ST para analizar el patrón de expresión global de 28869 genes bien anotados. Se utilizaron el kit Ambion WT Expression (Applied Biosystems) y el kit GeneChip WT Terminal Labeling and Control (Affymetrix) para amplificar y marcar 250 ng de muestras de ARN. Las muestras se hibridaron a 45 grados Celsius durante 16 horas y después se realizó un protocolo de lavado convencional usando GeneChip Fluidics Station 450 y las matrices se escanearon en un GeneChip Scanner 7G (Affymetrix).

Análisis de datos de micromatrices

Los datos de las micromatrices se analizaron con un Genespring GX10 (Agilent Biotechnologies). Los archivos de datos de Affymetrix se importaron usando algoritmos de RMA y se realizó la normalización de mediana. Con respecto a la comparación de las muestras del valor basal frente a la semana 2, el 20 % de los conjuntos de sondas con los niveles de expresión más bajos se retiró por filtración en la primera etapa, después la lista de conjuntos de sondas restantes se filtró mediante relación de cambio (corte de 1,2 veces) y se realizó un análisis estadístico usando la prueba U de Mann-Whitney por pares con pruebas múltiples de corrección de Benjamini-Hochberg.

Con respecto a la comparación de respondedor frente a no respondedor, el 20 % de los conjuntos de sondas con los niveles de expresión más bajos se retiró por filtración en la primera etapa, después la lista de conjuntos de sondas restantes se filtró mediante relación de cambio (corte de 1,2 veces) y se realizó un análisis estadístico usando una prueba T desapareada con corrección de Benjamini-Hochberg para ensayos múltiples. La categorización funcional de genes se realizó con el sistema de clasificación Panther (<http://www.pantherdb.org/>).

RT-QPCR

Se obtuvieron datos de expresión génica usando una matriz de baja densidad TaqMan (TLDA) (Applied Biosystems) que es una tarjeta microfluídica de 384 pocillos que permite realizar 384 ejecuciones simultáneas de PCR en tiempo real y que se ha usado para el perfil de expresión génica en varios estudios. Esta tarjeta microfluídica de rendimiento de bajo a medio permite que se hagan correr en paralelo 2 muestras frente a 96 blancos de ensayo de expresión génica TaqMan® que se precargan en cada uno de los pocillos en la tarjeta. Se generó ADNc con un kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se usó 1 microgramo de ARN por muestra en las ejecuciones de RT-PCR. Se usaron 400 ng (4 µl) de ADNc en cada muestra. Se añadieron 196 µl de agua exenta de nucleasas y 200 µl 2x de mezcla TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) para las mediciones de la PCR cuantitativa en tiempo real. Después, esta mezcla se dividió por igual sobre cuatro puertos de carga de muestras de la TLDA, cada uno conectado a un conjunto de 96 genes de interés. Las matrices se centrifugaron una vez (1', 1300 rpm a temperatura ambiente) para distribuir equitativamente la muestra sobre los pocillos. A continuación, la tarjeta se cerró herméticamente para prevenir un intercambio entre los pocillos. La amplificación de la RT-QPCR se ha ejecutado usando un sistema de detección de secuencias Prism 7900HT de Applied Biosystems con las siguientes condiciones de termociclador: 2 min a 50 °C y 10 min a 94,5 °C, seguido de 40 ciclos de 30 s a 97 °C y 1 min a 59,7 °C. Se seleccionaron 91 genes basándose en nuestro experimento de micromatrices previo y los 5 genes restantes eran genes constitutivos para normalización.

Análisis de datos de RT-QPCR

Los archivos de datos de RT-QPCR se importaron con el software Data Assist (Applied BioSystems) y los datos en bruto se normalizaron mediante el método ΔCt . La ciclofilina A (PPIA) se seleccionó como gen normalizador debido a que su expresión mostró la menor variación entre las muestras. Para encontrar genes expresados diferencialmente entre los grupos respondedores y no respondedores se realizaron un ensayo estadístico no paramétrico (prueba U de Mann-Whitney) y un análisis de variables canónicas (AVC).

Análisis de variables canónicas (AVC) o análisis discriminante lineal (ADL)

La separación entre grupos de objetos predefinidos se revela de la mejor manera mediante análisis de variables canónicas (AVC). El AVC es la generalización del análisis discriminante lineal (ADL), los dos términos se usan equitativamente en el estudio. El AVC se usó para determinar si los grupos de respondedores y no respondedores son separables en el espacio multidimensional abarcado por las variables genéticas, y si así fuera, qué subconjuntos de genes tienen el mejor poder discriminatorio. Los resultados del AVC son las denominadas puntuaciones canónicas obtenidas a partir de las funciones canónicas derivadas a través de un análisis propio, que sirven como coordenadas de observaciones en el espacio canónico.

Generación automática del panel génico

El análisis discriminante lineal (ADL) (Hamadeh HK et al. Prediction of compound signature using high density gene expression profiling. Toxicol Sci. 2002 Jun;67(2):232-40.) se usó para generar automáticamente paneles génicos que muestran una generación del 100 % entre respondedores y no respondedores en ambas condiciones y en ambas cohortes (ensayo y validación) de acuerdo con el siguiente algoritmo (se usaron 40 genes en EC y 41 genes en AR que se prefiltraron durante los experimentos con las cohortes de ensayo y se validaron en las cohortes de validación.):

- 1) Se crea el conjunto de "genes en el modelo". Inicialmente, este conjunto contiene todos los genes. También se crea un conjunto de genes con los denominados "genes protegidos". Inicialmente, este conjunto está vacío.
- 2) Se calcula para cada gen el valor F, que es la relación de la variabilidad entre grupos y la variabilidad dentro de grupos.
- 3) El algoritmo clasificador (ADL) se ejecuta utilizando el conjunto de "genes en el modelo" tanto en cohortes de ensayo como de validación. En ambos casos se registra un valor porcentual de precisión como los "mejores

valores de precisión".

4) El conjunto de "genes seleccionables" se define como:

"genes seleccionables" := "genes en el modelo" menos "genes protegidos"

5 Si el grupo de "genes seleccionables" no está vacío, entonces el algoritmo se continúa en la etapa 5, si no el algoritmo pasa a la etapa 7.

5) Se seleccionan genes desde el conjunto de "genes seleccionables" de acuerdo con los siguientes modelos:

- a) aleatoriamente con probabilidades iguales (**modelo uniforme**);
- b) aleatoriamente con una probabilidad que es inversamente proporcional a sus valor F (**modelo F_{prop}**);
- c) genes con los valores F más bajos (**modelo min F**).

10 En cualquier caso, el gen seleccionado se retira temporalmente del conjunto de "genes en el modelo". La ventaja de usar modelos estocásticos en lugar del modelo min F es que estos pueden proporcionar una segregación mejor de grupos de pacientes. Los modelos uniforme y F_{prop} representan algoritmos estocásticos mientras que el modelo min F es determinista.

6) El clasificador se ejecuta usando el conjunto (reducido temporalmente) de "genes en el modelo".

- 15 a) Si cualquiera de los dos valores porcentuales de precisión se hace inferior, el gen seleccionado se reinserta en el conjunto de "genes en el modelo" y se añade al conjunto de "genes protegidos".
- b) Si ambos valores porcentuales de precisión son al menos tan buenos como los "mejores valores de precisión", el gen seleccionado se retira permanentemente de los "genes en el modelo" y el conjunto de "genes protegidos" se vacía. Los "mejores valores de precisión" se sobrescriben con los valores de precisión
- 20 calculados.

El algoritmo vuelve a la etapa 4.

7) El algoritmo finaliza. Los resultados son el conjunto de "genes en el modelo" y los "mejores valores de precisión". El análisis discriminante lineal se realizó usando el software R (R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.) con el paquete MASS (Venables, W. N. & Ripley, B. D. (2002) Modern Applied Statistics with S. Cuarta edición. Springer, New York) y el paquete wordcloud (Ian Fellows (2012). wordcloud: Word Clouds. R package versión 2.0. <http://CRAN.R-project.org/package=wordcloud>) para visualización.

Ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA)

30 Para determinar los niveles séricos de IL-6, IL-8, IL-12, IFN γ , TNF α , infliximab y anticuerpo anti-infliximab, se realizaron ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA). Se usaron los kits Quantikin ELISA (R&D Systems) para mediciones de IL-6, IL-8, IL-12 y IFN γ de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los niveles de TNF α , infliximab y anticuerpos anti-infliximab se midieron mediante el kit LISA -TRACKER Premium Infliximab (BioMedical Diagnostics). Los resultados se dieron en pg/ml. Los datos se analizaron usando GraphPad Prism, y se usó la prueba U de Mann-Whitney ($p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo).

Ejemplos

Ejemplo 1

Análisis global de expresión génica de muestras de cohorte de ensayo de artritis reumatoide

Grupos de pacientes de cohorte de ensayo de artritis reumatoide

40 Se incluyeron muestras de 19 pacientes en el periodo basal y en la semana 2 en los experimentos de micromatrices. Los médicos clínicos identificaron 6 respondedores y 13 respondedores nulos o moderados. Cada paciente tuvo la misma terapia básica y era no fumador. Entre los grupos no respondedores (NR) y respondedores (R), no hubo diferencias significativas con respecto a la edad, DAS28, HAQ, CRP, factor reumatoide, anti-CCP o DMARD (Tabla 1).

45 **Tabla 1:** Parámetros clínicos acumulados de grupos de pacientes en AR en la cohorte de ensayo. NS significa no significativo, DAS28, HAQ y DMARD son datos de puntuación.

		Respondedores (ACR70-50)	Respondedores nulos o moderados (ACR20-0)
A la semana 0		6	13
Género	Masculino/ Femenino	1/5	2/11

(continuación)

		Respondedores (ACR70-50)	Respondedores nulos o moderados (ACR20-0)
Edad	NS	44,33	47,08
DAS28	NS	5,63	5,26
HAQ	NS	1,27	2,06
CRP (mg/l)	NS	16,83	28,31
DMARD	NS	2,83	2,69
RF (IU/ml)	NS	105,83	148,62
CCP (IU/ml)	NS	675,78	756,31

Análisis de micromatrices

5 El perfil de expresión génica global reveló genes con diferencias estadísticamente significativas entre respondedores y no respondedores en el período basal. El análisis de las muestras obtenidas a la semana 2 mostró genes con diferencias estadísticamente significativas entre respondedores y no respondedores. La expresión de algunos genes fue significativamente diferente incluso en el período basal (EPST11, IFI44, IFIT1, IFIT2, IFIT3, RFC1 y RSAD2); mientras que otros se expresaron de manera diferente a la semana 2 (FCGR3A, GPAM, MICA, ELOVL7, PF4, RGS1 y SNORD41). Muchos de estos genes tienen una relación con AR de acuerdo con la bibliografía (FCGR3A, MICA, PF4, IFIT1, etc.)

10 La comparación entre las muestras del período basal y a la semana 2 dio como resultado **una lista de 3 genes (AQP9, IGJ y TNFAIP6) con diferencias estadísticamente significativas** incluso con la corrección de Benjamini-Hochberg para ensayos múltiples. Estos genes representan los efectos de la terapia a lo largo del tiempo (Figura 3).

Ejemplo 2

15 Validación con RT-QPCR de paneles génicos de artritis reumatoide

Grupos de pacientes de cohorte de validación de artritis reumatoide

Los médicos clínicos identificaron 4 respondedores y 11 respondedores nulos o moderados. Cada paciente tuvo la misma terapia básica y era no fumador. Entre los grupos no respondedores (NR) y respondedores (R), no hubo diferencias significativas con respecto a la edad, DAS28, HAQ, CRP o DMARDs (Tabla 2).

20 **Tabla 2:** *Parámetros clínicos acumulados de grupos de pacientes en AR en la cohorte de validación. También se muestran entre paréntesis los datos de la cohorte de ensayo. DAS28, HAQ y DMARD son datos de puntuación.*

		Respondedores	Respondedores nulos o moderados
A la semana 0	(cohorte de ensayo)	4 (6)	11 (13)
Género	Masculino/Femenino	0/4 (1/5)	3/8 (2/11)
Edad	No significativo	54 (44,33)	56,2 (47,08)
DAS28	No significativo	5,23 (5,63)	5,44 (5,26)
HAQ	No significativo	1,59 (1,27)	1,93 (2,06)
CRP (mg/l)	No significativo	18,9 (16,83)	9,58 (28,31)
DMARD	No significativo	3 (2,83)	2,7 (2,69)

Análisis RT-QPCR

25 En los experimentos de RT-QPCR se incluyeron muestras de 15 pacientes a la semana 0 y de 5 pacientes desde la cohorte de ensayo para validación técnica - 2 respondedores, 3 no respondedores. La configuración de los ensayos

q-PCR de validación se realizó de la siguiente manera: en base a las micromatrices de la cohorte de ensayo, se probó que 29 conjuntos de sonda eran estadísticamente significativas en el periodo basal con respecto a la comparación entre no respondedor frente a respondedor, fuera de las cuales se incluyeron 27 genes (se excluyeron genes sin anotación y ARN nucleolares pequeños) en las tarjetas de TLDA así como 6 genes de la comparación de NR frente a R a la semana 2, y se seleccionaron 10 genes de la literatura. A parte de esto, se usaron 41 genes en el análisis final como se describe más adelante (se excluyeron genes que no muestran diferencias). Los experimentos con RT-QPCR dieron como resultado **4 genes que muestran diferencias estadísticamente significativas** (prueba U de Mann-Whitney unilateral) entre NR y R (Figura 4). También se ejecutó la validación técnica y se probó que era satisfactoria.

10 **Ejemplo 3**

Análisis global de expresión génica de muestras de cohorte de ensayo de enfermedad de Crohn

Grupos de pacientes de cohorte de ensayo de enfermedad de Crohn

Se incluyeron muestras de 20 pacientes en el periodo basal y en la semana 2 en los experimentos de micromatrices (cohorte de ensayo). Los médicos clínicos identificaron 14 respondedores y 6 no respondedores. Cada paciente tuvo la misma terapia básica y era no fumador. Entre los grupos no respondedores (NR) y respondedores (R), no hubo diferencias significativas con respecto a la edad, CDAI, CRP, hemoglobina, leucocitos o neutrófilos (Tabla 3).

Tabla 3: Parámetros clínicos acumulados de grupos de pacientes en EC en la cohorte de ensayo. El CDAI, índice de actividad de enfermedad de Crohn es una puntuación

		Respondedores	No respondedores
A la semana 0		14	6
Género	Masculino/Femenino	8/6	3/3
Edad	No significativo	36,2	36
CDAI	No significativo	319,6	351,5
CRP (mg/l)	No significativo	22,78	13,59
Hemoglobina (g/l)	No significativo	125,1	120,6
Leucocitos (G/l)	No significativo	9,02	8,01
Neutrófilos (%)	No significativo	70,0	74,5

20 **Análisis de micromatrices**

El perfil de expresión génica global reveló genes con diferencias estadísticamente significativas entre respondedores y no respondedores en el periodo basal. El análisis de las muestras obtenidas a la semana 2 mostró genes con diferencias estadísticamente significativas entre respondedores y no respondedores. Algunos de estos genes estaban del mismo modo cambiando significativamente en el periodo basal (DDX11L2, BMP6, THEM5 y ABCC4); mientras que otros fueron nuevos descubrimientos a la semana 2 (GPR34, PRDM1, IL1RL1, CA2, MMD, SCL7A5, CADM2 y RAD23A). Muchos de estos genes tienen una relación con EC de acuerdo con la literatura (BMP6, ABCC4, CA2, IL1RL1 y PRDM1). La comparación de las muestras en el periodo basal y en la semana 2 dio como resultado una lista de 5 genes (AQP9, IGKC, MGAM, MMP8 y TNFAIP6) con diferencias estadísticamente significativas. Estos genes representan los efectos de la terapia a lo largo del tiempo (Figura 5).

30 **Ejemplo 4**

Validación con RT-QPCR de paneles génicos de enfermedad de Crohn

Grupos de pacientes de cohorte de validación de enfermedad de Crohn

Se incluyeron muestras de 20 pacientes en el periodo basal en los experimentos de RT-QPCR (cohorte de validación). Los médicos clínicos identificaron 13 respondedores y 7 no respondedores. Cada paciente tuvo la misma terapia básica y era no fumador. Entre los grupos no respondedores (NR) y respondedores (R), no hubo diferencias significativas con respecto a la edad, CDAI, CRP, hemoglobina, leucocitos o neutrófilos (Tabla 4).

Tabla 4: Parámetros clínicos acumulados de grupos de pacientes en EC en la cohorte de validación. También se muestran entre paréntesis los datos de la cohorte de ensayo. El CDAI, índice de actividad de enfermedad de Crohn es una puntuación. Análisis RT-QPCR

		Respondedores	No respondedores
En el periodo basal	(cohorte de ensayo)	13 (14)	7 (6)
Género	Masculino/Femenino	8/5 (8/6)	4/4 (4/3)
Edad	No significativo	26,8 (36,2)	30,2 (36)
CDAI	No significativo	338,3 (319,6)	370,7 (351,5)
CRP (mg/l)	No significativo	27,2 (22,78)	16,5 (13,59)
Hemoglobina (g/l)	No significativo	130 (125,1)	127 (120,6)
Leucocitos (G/l)	No significativo	7,58 (9,02)	9,24 (8,01)
Neutrófilos (%)	No significativo	74,0 (70,0)	72,83 (74,5)

- 5 La configuración de los ensayos q-PCR de validación se realizó de la siguiente manera: en base a las 40 micromatrices en la cohorte de ensayo, se probó que 49 conjuntos de sondas eran estadísticamente significativos en el periodo basal con respecto a la comparación entre no respondedor frente a respondedor, fuera de las cuales se incluyeron 36 genes (se excluyeron genes sin anotación y ARN nucleolares pequeños) en las tarjetas de TLDA así como 8 genes de la comparación de NR frente a R a la semana 2, y 7 genes de la literatura. A parte de esto, se usaron 40 genes en el análisis final como se describe más adelante (se excluyeron genes que no muestran diferencias). Los experimentos de RT-QPCR dieron como resultado 4 genes que muestran diferencias estadísticamente significativas (prueba U de Mann-Whitney unilateral) entre NR y R (Figura 6).

Ejemplo 5

Análisis bioestadístico de datos de expresión

- 15 Se realizó un análisis estadístico utilizando datos de expresión génica de los 40/41 genes (AR/EC) prefiltrados en ambas cohortes utilizando la generación automática de panel génico descrita con detalle anteriormente, se diseñó un algoritmo para encontrar los mejores paneles génicos que discriminan entre respondedores y no respondedores.

El algoritmo se ejecutó con el **min_F** determinista y 5000 veces con ambos modelos estocásticos. En la AR **F_prop** produjo 4747 combinaciones de paneles génicos que muestran un 100 % de segregación entre respondedores y no respondedores tanto en las cohortes de ensayo como de validación (usando micromatrices y datos de RT-QPCR, respectivamente), mientras que **uniform** produjo incluso más, 4909 paneles génicos. En la EC, estos números fueron 4657 para **F_prop** y 4878 para **uniform**. El modelo **min_F** también produjo una segregación del 100 %, pero debe indicarse que los modelos estocásticos produjeron una segregación mucho más profunda en términos de indicadores de precisión en ambas enfermedades. El alto número de paneles génicos que proporcionan una segregación del 100 % generados mediante 5000 ejecuciones sugiere que hay otros paneles con una segregación del 100 %, se estima que el número total de estos paneles excede los 50.000.

La validación cruzada es una manera de predecir el ajuste de un modelo a un conjunto de validación hipotético cuando no está disponible un conjunto de validación explícito. Usamos una validación cruzada dejando uno fuera (LOOCV) que implica usar una sola observación de la muestra original como los datos de validación, y las observaciones restantes como datos de entrenamiento. Esto se repite de tal manera que cada observación en la muestra se usa una vez como los datos de validación. Para la visualización, se seleccionaron 3-3 paneles génicos con el mejor poder discriminatorio considerando valores F, datos de validación cruzada y márgenes entre los grupos segregados. Una lista de genes con los valores p más altos en el experimento de micromatrices sirvió como controles negativos que no muestran segregación (Tabla 5).

- 35 El panel génico para AR con el mejor poder discriminatorio incluía genes, tales como CNTNAP3, CYP4F3, GZMB, MME, MX1, RAVR2, SERPINB10 y TNFAIP6 (RA1); mientras que el segundo panel génico contenía CNTNAP3, CYP4F3, EPST11, MME, RGS1, SERPINB10 y TNFAIP6 (RA2); y el tercero consistía en FCGR3A, GPAM, GZMB, IFI35, MME, PTGS2, RAVR2, RFC1 y RSAD2 (RA3). (Figura 7).

40 El panel génico para EC con el mejor poder discriminatorio incluía genes, tales como ARHGEF12, ENDOD1, FCGR1A, GCLC, GPR34, KAT2B, MAP1LC3B y ODC1 (CD1); mientras que el segundo panel génico contenía ABCC4, AIDA, ARHGEF12, CADM2, FMN1, KAT2B, ODC1, PCYT1B y RNASE2 (CD2); el tercero consistía en AIDA, CADM2, GCLC, KAT2B, MMD, PCYT1B, PIP5K1B, RIOK3 y RNF11 (CD3). (Figura 8)

Tabla 5: Indicadores de precisión de los paneles génicos seleccionados para visualización. Se presentan datos de segregación y validación cruzada de cada panel génico seleccionado así como también del control negativo.

Panel génico	RA1		RA2		RA3		Control negativo
Cohorte de artritis reumatoide	Cohorte de ensayo	Cohorte de validación	Cohorte de ensayo	Cohorte de validación	Cohorte de ensayo	Cohorte de validación	Cohorte de ensayo
Segregación de los grupos	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	53%
Resultado de validación cruzada	100 %	87%	95%	93%	95%	87%	-
Fuente de datos	Micromatriz	RT-QPCR	Micromatriz	RT-QPCR	Micromatriz	RT-QPCR	Micromatriz
Panel génico N.º	CD1		CD2		CD3		Control negativo
Cohorte de enfermedad de Crohn	Cohorte de ensayo	Cohorte de validación	Cohorte de ensayo	Cohorte de validación	Cohorte de ensayo	Cohorte de validación	Cohorte de ensayo
Segregación de los grupos	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	55%
Resultado de validación cruzada	95%	80%	90%	85%	90%	80%	-
Fuente de datos	Micromatriz	RT-QPCR	Micromatriz	RT-QPCR	Micromatriz	RT-QPCR	Micromatriz

5 En las figuras 9 y 10, el número de genes dentro de cada panel que muestran una segregación del 100 % entre respondedores y no respondedores y el valor F más bajo calculado para cada grupo de pacientes (cuanto mayor es el valor F, mejor es la segregación, lo que significa que la selección del valor F mínimo representa el punto más débil del modelo) se muestran ordenados por valor F para revelar el número estimado de paneles génicos con el poder discriminatorio más alto. El punto de inflexión de la curva de valor F mínimo muestra que en AR aproximadamente 350 mientras que en EC 200 paneles génicos dieron como resultado una discriminación fuerte, observando que 10 todos los paneles génicos en la gráfica han conducido a una diferenciación del 100 % entre respondedores y no respondedores.

Ejemplo 6

Análisis ELISA

15 Se realizaron mediciones de ELISA para determinar los niveles de proteína en suero de cinco citocinas proinflamatorias (TNF α , IL6, IL8, IFN γ y IL12), el anticuerpo monoclonal terapéutico infliximab y el anticuerpo anti-fármaco (anti-infliximab). La Tabla 6 muestra que basándose en un análisis estadístico, se encuentra una diferencia significativa en AR entre respondedores y no respondedores en el periodo basal en el nivel de IL-12, mientras que en EC, el nivel de IFN γ volvió a ser estadísticamente diferente. Se midió TNF α con un kit TRACKER Premium Infliximab en la cohorte de AR. En las figuras 11 - 13 se muestran diagramas de dispersión detallados de las 20 comparaciones **significativas**.

Tabla 6: Se obtuvieron valores estadísticos de valores p de ELISA de medición de citocina mediante el análisis estadístico de datos de nivel de citocina de grupos de NR frente a R y de periodo basal frente a la semana 2 usando una prueba U de Mann-Whitney. Los números en negrita representan valores estadísticamente significativos.

	Artritis reumatoide		Enfermedad de Crohn	
	NR frente a R en periodo basal	Periodo basal frente a semana 2	NR frente a R en periodo basal	Periodo basal frente a semana 2
IL6	0,2	0,03	0,2	0,005
IL8	0,3	0,01	0,9	0,06
IL12	0,05	0,05	0,6	0,8
IFNg	0,5	0,5	0,02	0,06
TNF	0,2	0,67		

- 5 También se realizaron experimentos de prueba ELISA de TNF α , infliximab y anti-infliximab para probar el kit LISA - TRACKER Premium Infliximab. Por la cantidad limitada del kit sólo pudieron incluirse muestras de las cohortes de ensayo. Se incluyeron las siguientes muestras:

TNFα	17 AR en periodo basal,	17 AR a la semana 2	7 AR a la semana 14
Infliximab	16 EC a la semana 2	19 AR a la semana 2	7 AR a la semana 14
Anti-infliximab	17 EC a la semana 2	19 AR a la semana 2	7 AR a la semana 14

Por lo tanto, sólo se midió TNF α en muestras de pacientes con AR de la cohorte de ensayo pero no pudo detectarse diferencia entre respondedores y no respondedores en periodo basal o a la semana 2 o en comparaciones del periodo basal frente a la semana 2 (Figuras 14 - 16).

- 10 Se midieron infliximab y anti-infliximab en muestras a la semana 2 y a la semana 14 de AR y EC (cohorte de ensayo) (Figuras 17 - 19). Sólo pudieron detectarse niveles de anti-infliximab en 3 muestras que representan pacientes que mostraron niveles cero de infliximab a la semana 14.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para predecir si un paciente que tiene artritis reumatoide respondería a un tratamiento con un inhibidor de TNF α , método que comprende determinar el nivel de expresión de genes CNTNAP3, CYP4F3, GZMB, MME, MX1, RAVER2, SERPINB10 y TNFAIP6, o el nivel de expresión de genes CNTNAP3, CYP4F3, EPST11, MME, RGS1, SERPINB10 y TNFAIP6, o el nivel de expresión de genes FCGR3A, GPAM, GZMB, IFI35, MME, PTGS2, RAVER2, RFC1 y RSAD2 en una muestra de sangre de dicho paciente.
5
2. El método de la reivindicación 1, en el que los niveles de expresión relativos de los genes seleccionados se determinan en comparación a un gen constitutivo.
3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el inhibidor de TNF α es un anticuerpo anti-TNF α , una proteína de fusión de TNF o una proteína de unión a TNF recombinante.
10
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el inhibidor de TNF α es Adalimumab, Certolizumab pegol, Etanercept, Golimumab, Infliximab o Pegsunercept.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además la etapa de comparar el nivel de expresión de dichos genes con valores de referencia obtenidos a partir de grupos de pacientes respondedores y no respondedores.
15
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el nivel de expresión se determina cuantificando el nivel de ARNm de dichos genes en la muestra de sangre.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además la etapa de determinar el nivel de una proteína biomarcadora.

20

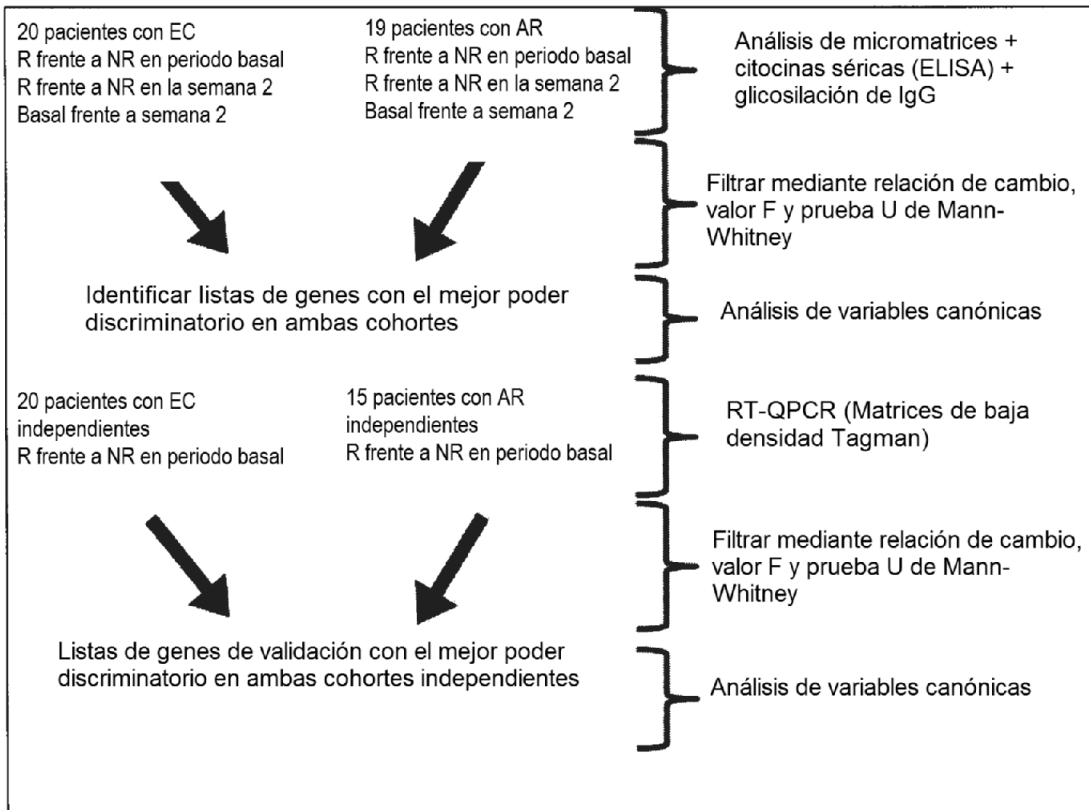


Figura 1

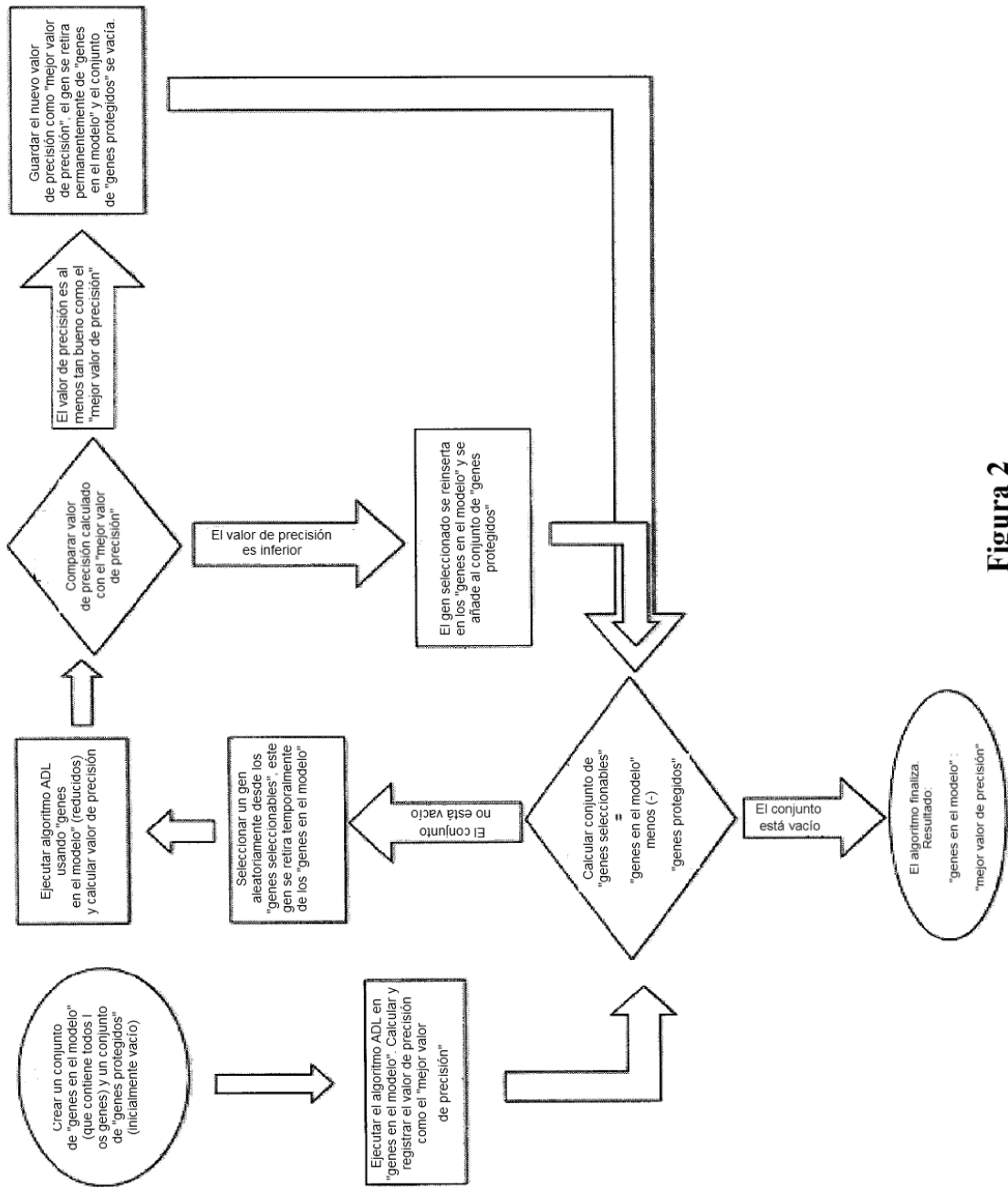


Figura 2

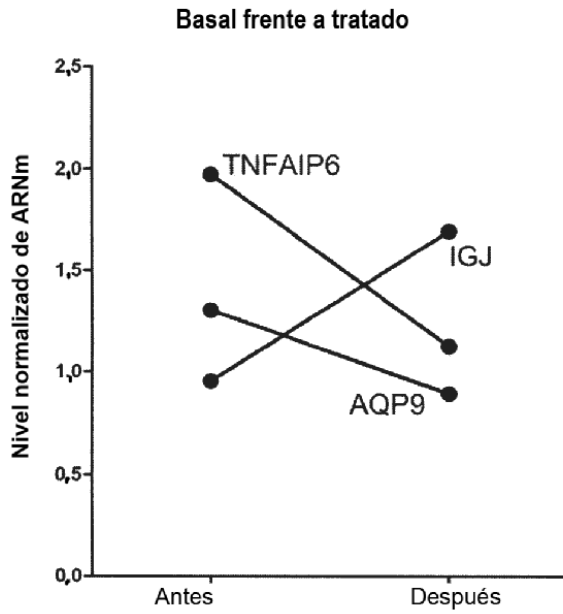


Figura 3

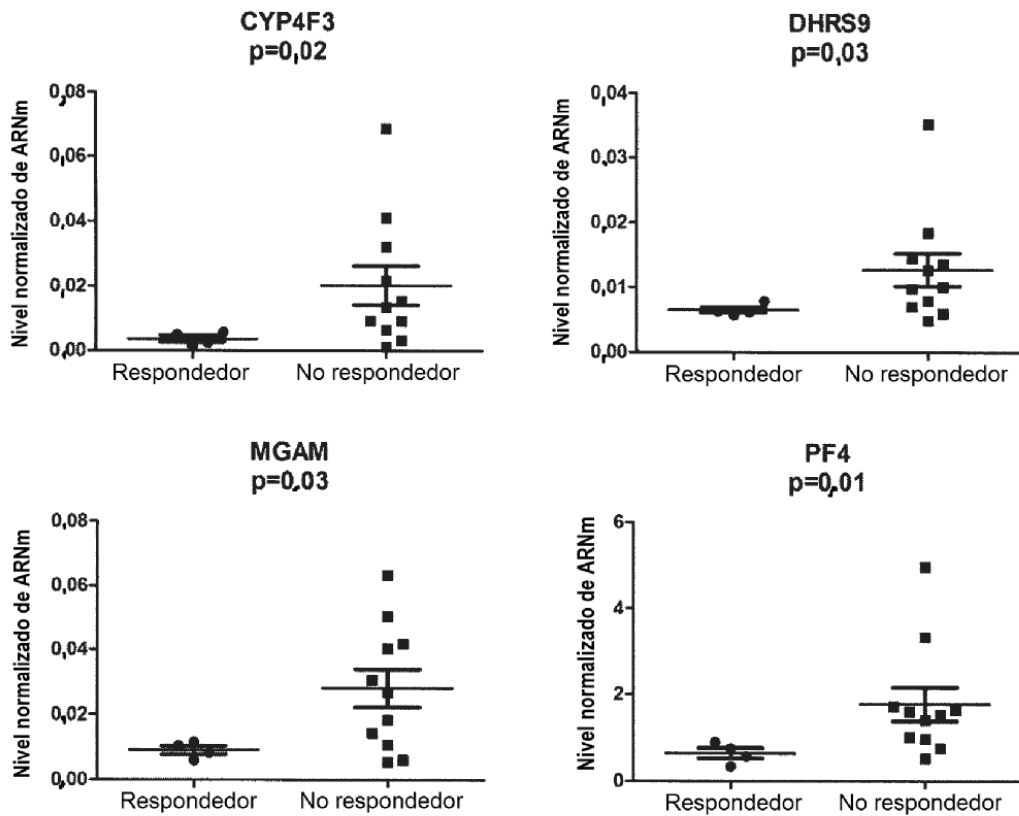


Figura 4

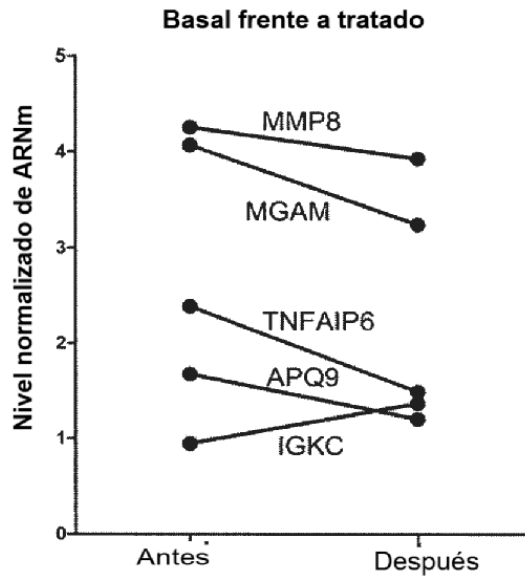


Figura 5

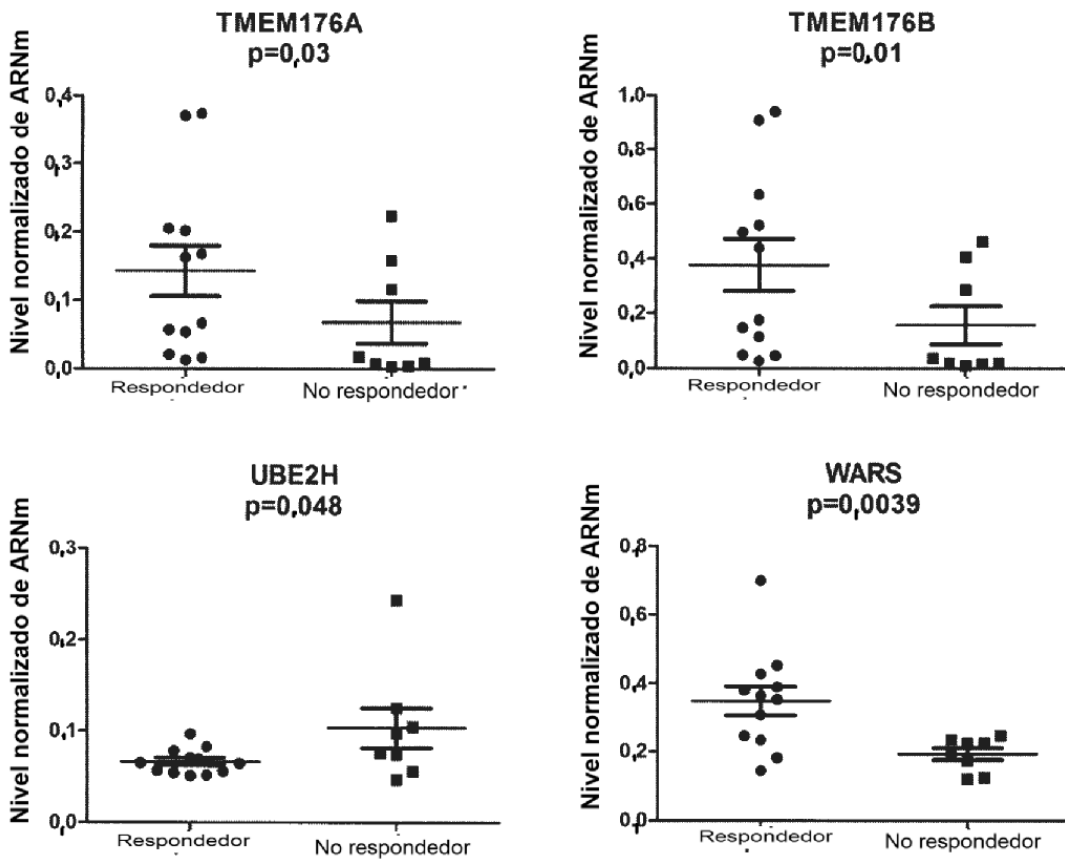


Figura 6

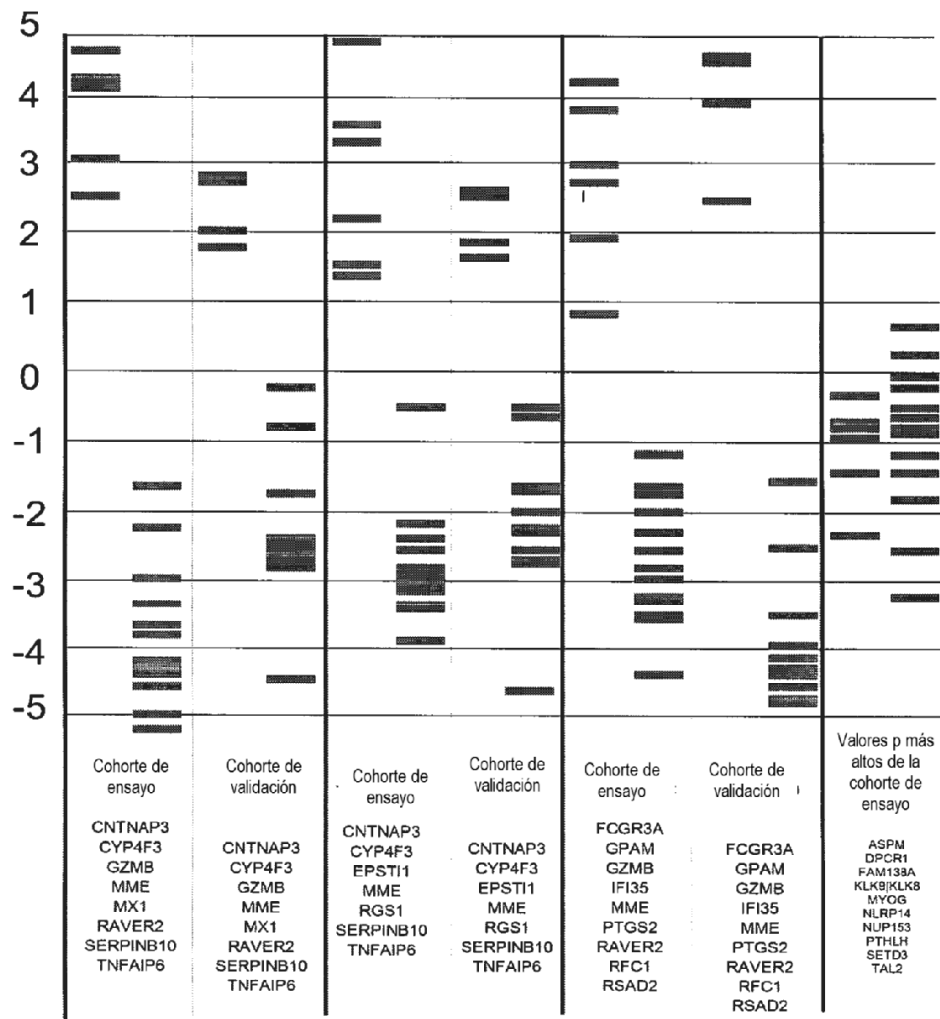


Figura 7

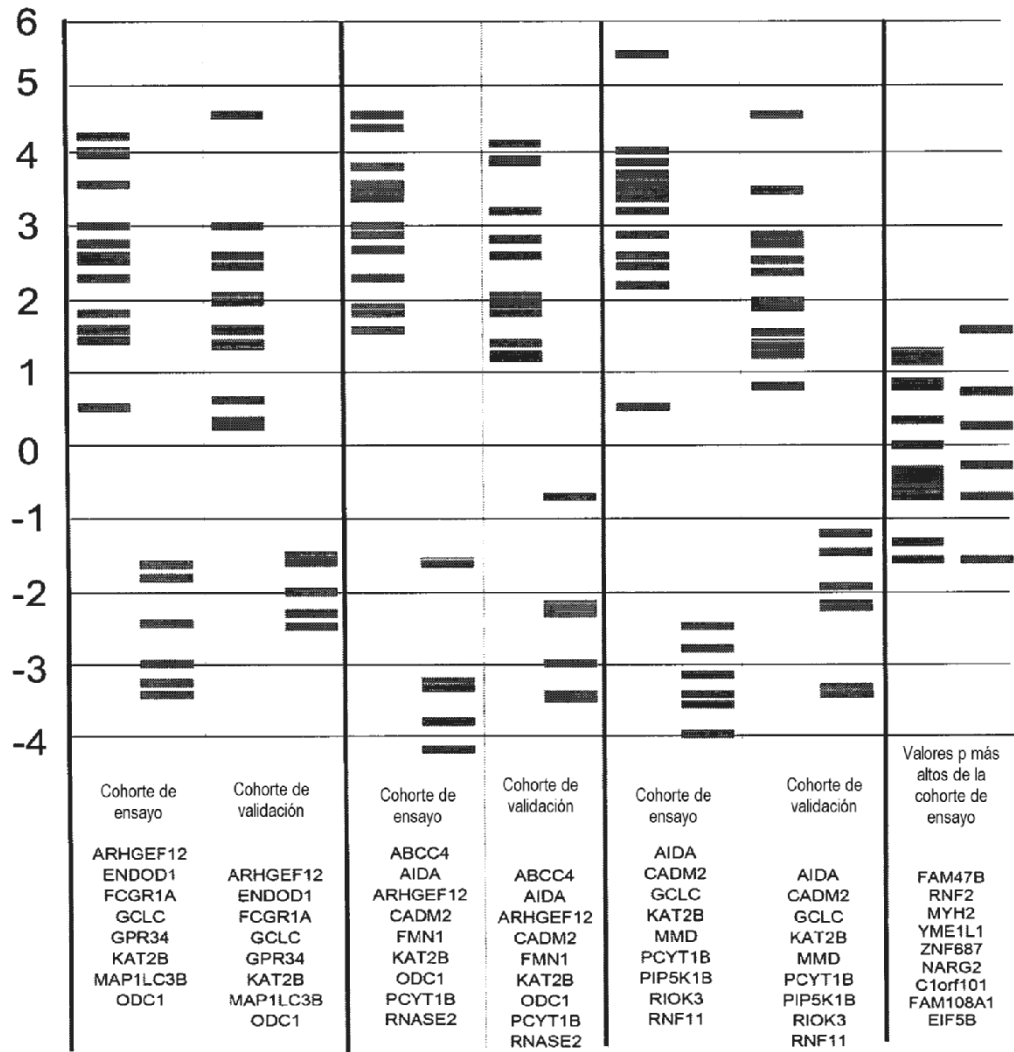


Figura 8

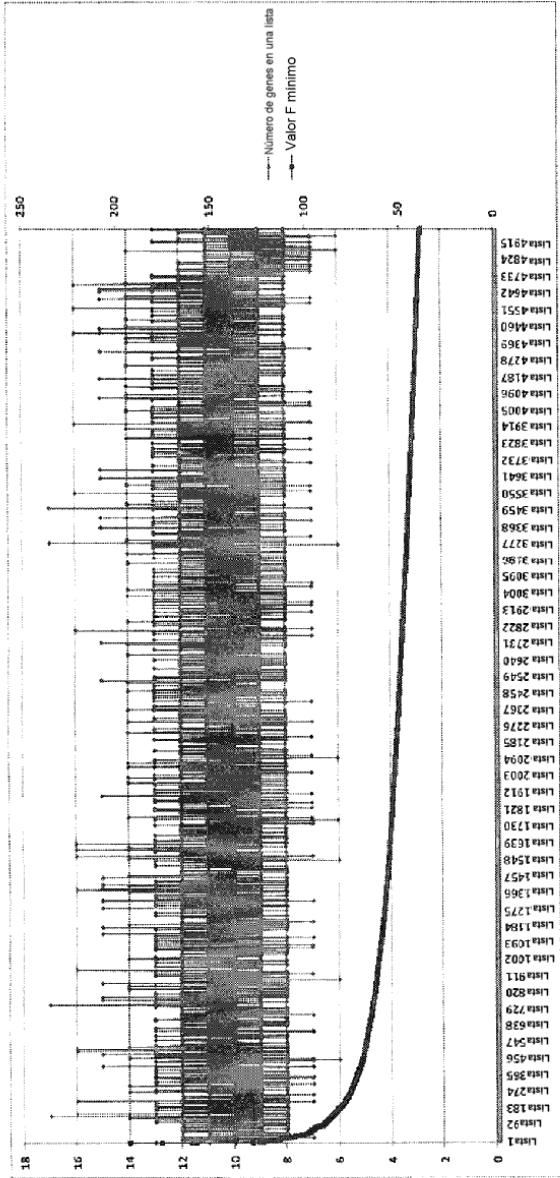


Figura 9

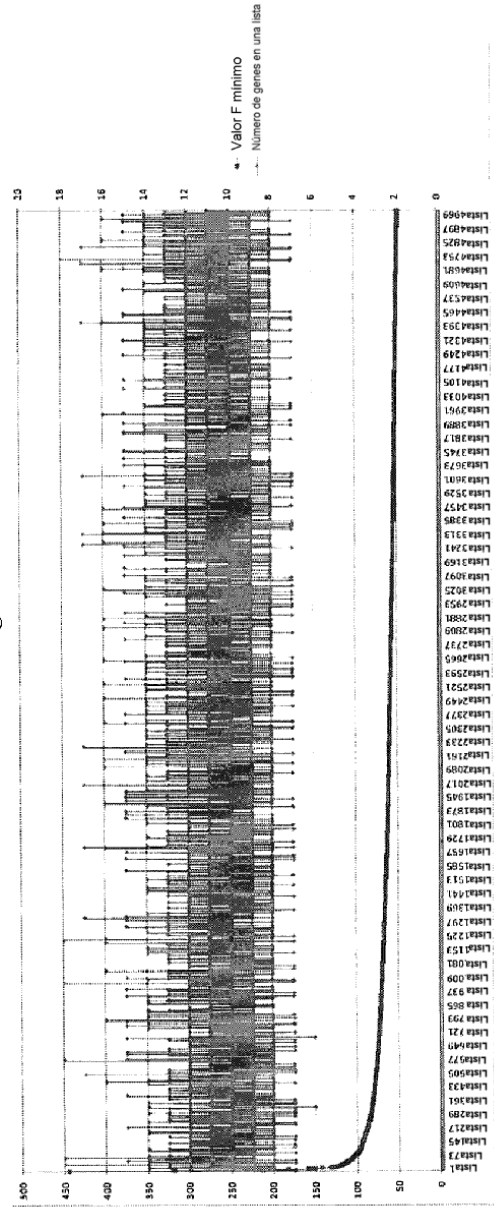


Figura 10

IFN gamma (pg/ml) en enfermedad de Crohn en periodo basal
p= 0,02

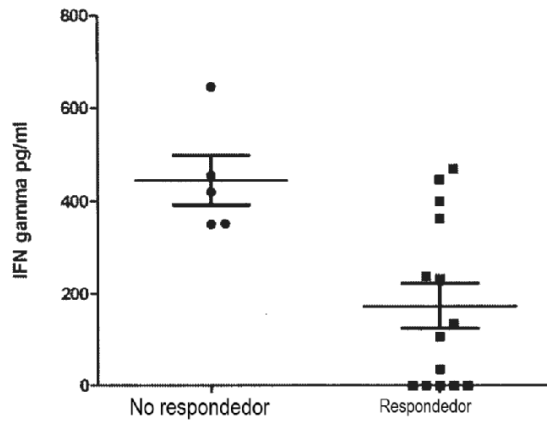


Figura 11

IL-6 (pg/ml) en enfermedad de Crohn
p=0,005

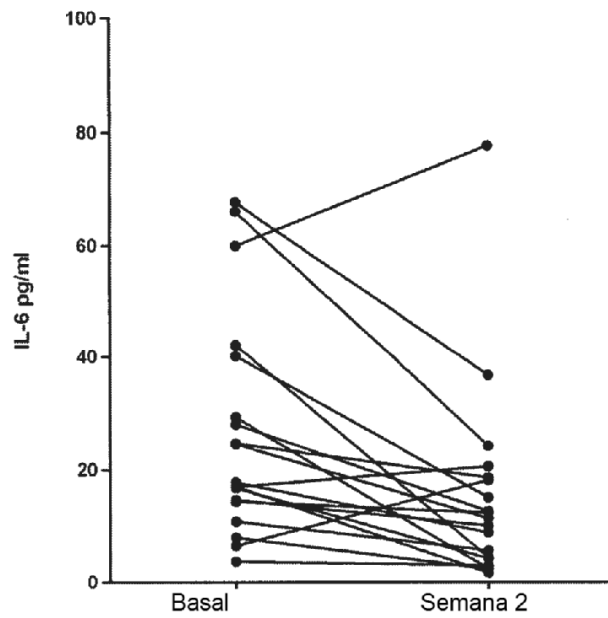


Figura 12

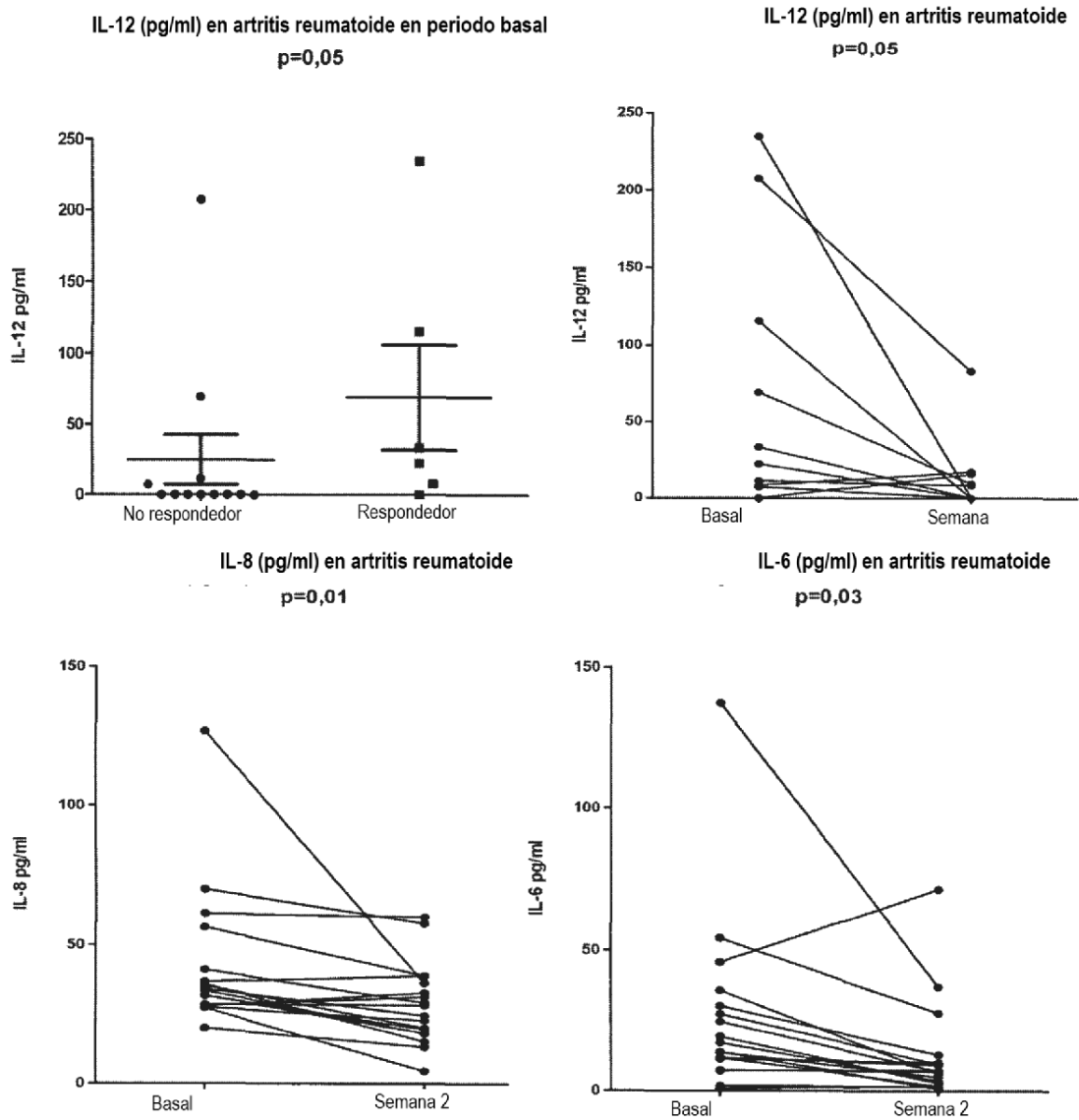


Figura 13

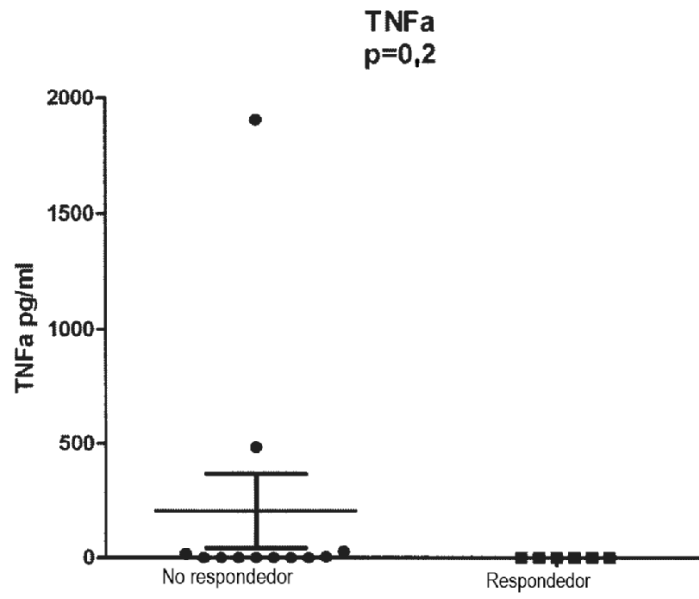


Figura 14

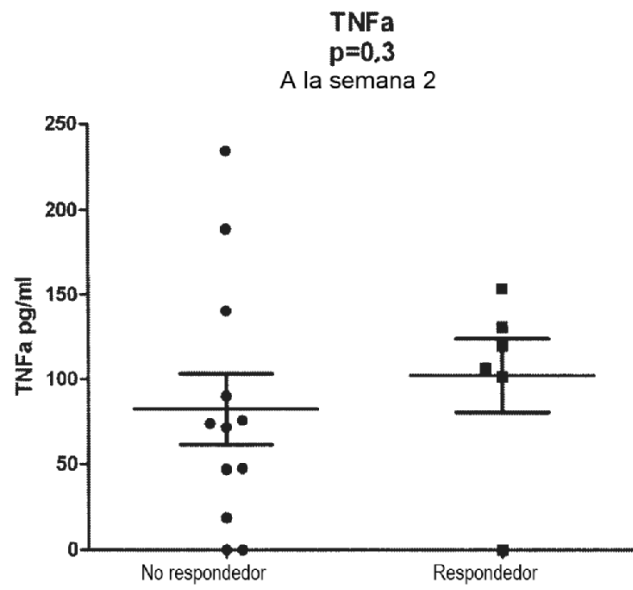


Figura 15

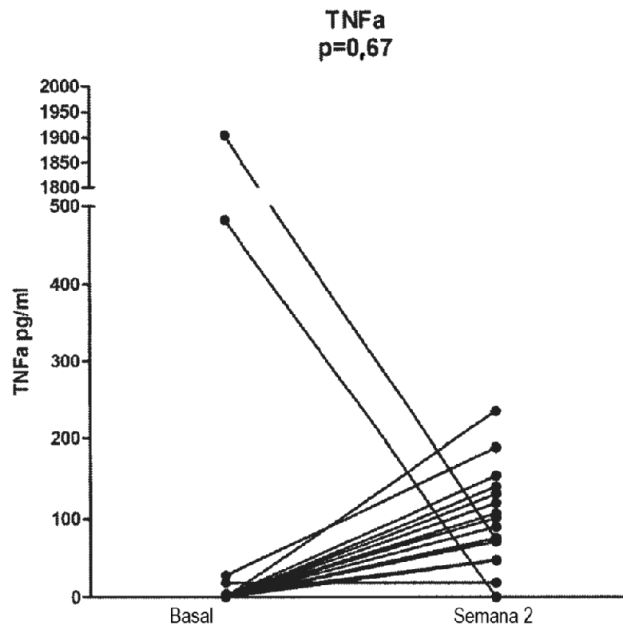


Figura 16

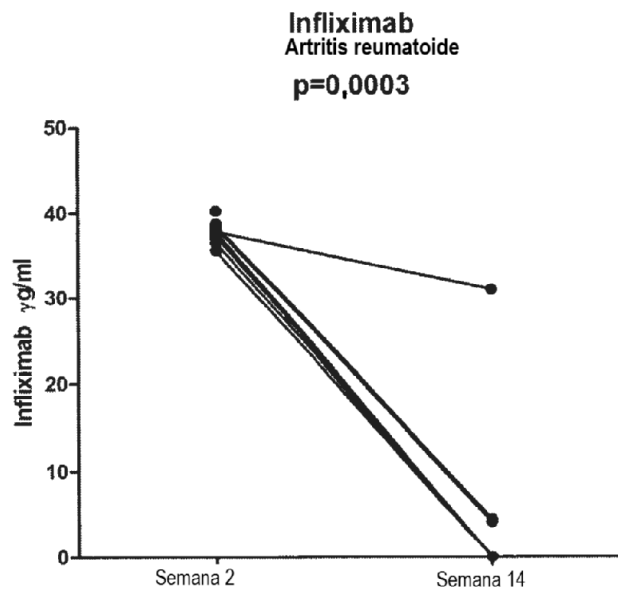


Figura 17

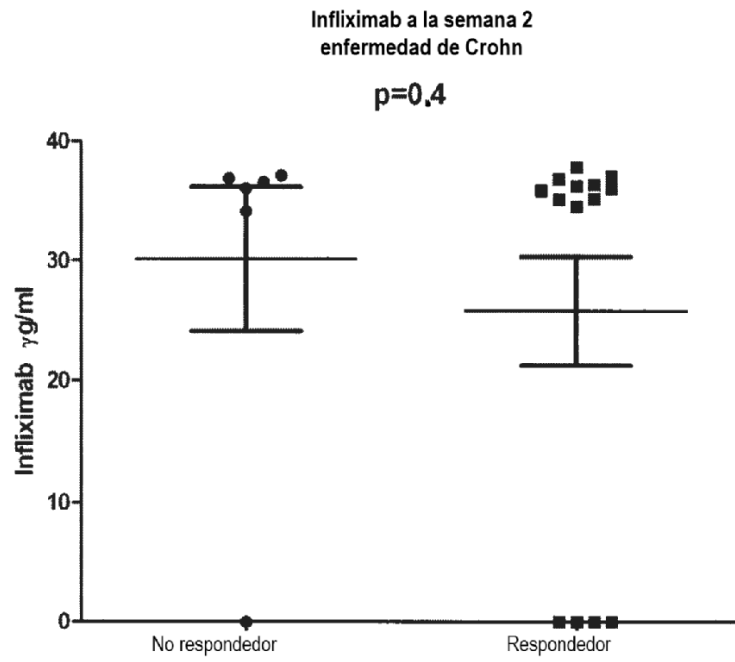


Figura 18

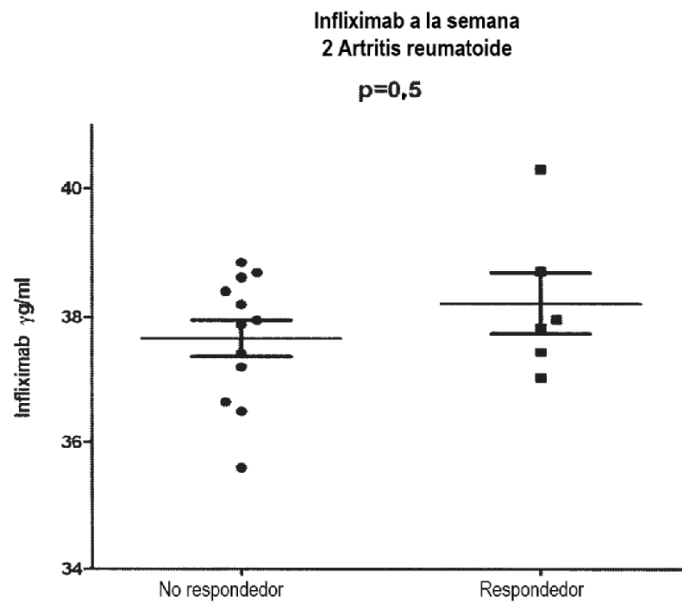


Figura 19