

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 838**

21 Número de solicitud: 202330350

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

04.05.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

21.11.2024

71 Solicitantes:

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (75.0%)

Avenida de la Constitución 18

41071 Sevilla (Sevilla) ES;

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA (12.5%) y

**CONSORCIO CENTRO DE INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA EN RED (12.5%)**

72 Inventor/es:

FERRÍN SÁNCHEZ, Gustavo;

MEDINA MEDINA, Rosario;

AGUILAR MELERO, Patricia;

IGLESIAS FLORES, Eva;

BENÍTEZ CANTERO, José Manuel;

MARÍN PEDROSA, Sandra;

GARCÍA SÁNCHEZ, María Del Valle y

RODRÍGUEZ PERÁLVAREZ, Manuel Luís

74 Agente/Representante:

SAN MARTÍN ALARCIA, Esther

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico

54 Título: **Método para predecir la respuesta del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α**

57 Resumen:

Método para predecir la respuesta del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α basado en los niveles plasmáticos de vinculina junto con el índice de actividad de la enfermedad de Crohn (CDAI), la inducción con corticosteroides y la resección intestinal.

ES 2 988 838 A1

DESCRIPCIÓN

Método para predecir la respuesta del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se enmarca en el campo de la Medicina, concretamente en el estudio y tratamiento de enfermedades autoinmunes, como la enfermedad de Crohn. La invención se centra en el pronóstico individualizado de la efectividad del tratamiento con los inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa (anti-TNF- α) aplicado en dicha enfermedad.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

- 10 La enfermedad de Crohn (EC) es una enfermedad intestinal inflamatoria crónica (EII) que resulta de una respuesta inmunitaria anormal a los microbios entéricos en individuos genéticamente predispuestos, y puede afectar a cualquier localización del tracto gastrointestinal.

- La terapia clásica contra la EC consiste en distintas combinaciones de corticosteroides, agentes inmunosupresores y, en algunos casos, cirugía. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado nuevos fármacos biológicos. Entre ellos destacan los inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa o anti-TNF- α , también llamados “**anti-TNF- α** ” que corresponde a las siglas en inglés de “Tumoral Necrosis Factor alpha”. Algunos de estos compuestos, como infliximab, adalimumab y biosimilares, se han convertido en una
- 15 20 modalidad terapéutica primordial en la EC [1,2].

- El anti-TNF- α es una citocina ubicua cuyos niveles en sangre aumentan significativamente durante el proceso inflamatorio que tiene lugar en la EII. Los agentes anti-TNF- α se unen al TNF- α soluble y a su precursor transmembrana, bloqueando así la interacción entre el TNF- α y los receptores TNF tipo 1 y 2, y la subsiguiente señalización celular proinflamatoria. El
- 25 30 uso de agentes anti-TNF favorece la cicatrización de la mucosa, evita la necesidad de corticoides y reduce la necesidad de cirugía y hospitalizaciones, mejorando así la calidad de vida de los pacientes con EII [3]. Sin embargo, su eficacia en pacientes con EC es heterogénea. La falta de respuesta primaria al tratamiento anti-TNF- α se produce en hasta el 40% de los pacientes con EII en ensayos randomizados, y en el 10-20% de los pacientes en series reales. La pérdida de respuesta secundaria también es frecuente en pacientes con

EC, con una incidencia que oscila entre el 23% y el 46% a los 12 meses del inicio del tratamiento anti-TNF- α [4,5]. Además, el uso crónico de inhibidores del TNF- α es caro y conlleva un riesgo significativo de infecciones, acontecimientos autoinmunitarios paradójicos, trastornos linfoproliferativos, enfermedades desmielinizantes y cardiopatías [2].

- 5 La identificación de predictores no invasivos de respuesta a la terapia anti-TNF- α permitiría una prescripción más eficiente de estos fármacos, optimizando así las indicaciones y minimizando los efectos secundarios y los costes. Esto resulta especialmente atractivo en la EC dada la disponibilidad de otras terapias biológicas dirigidas a diferentes vías moleculares (por ejemplo, la integrina anti- $\alpha 4\beta 7$, la subunidad anti-p40 de la interleucina-12 y la
10 interleucina-23).

Varios estudios han tratado de identificar biomarcadores fiables de respuesta a los agentes anti-TNF- α , la mayoría de ellos centrados en la farmacogenómica. Se han identificado variaciones genéticas relacionadas con el receptor Fc, la apoptosis, la señalización del TNF y la autofagia. Otros estudios se han centrado en la abundancia de ARNm en sangre
15 periférica y tejido intestinal, en el análisis de la microbiota o en marcadores proteicos [6]. Sin embargo, ninguno de ellos era lo suficientemente preciso como para aplicarlo en la práctica clínica habitual.

La proteómica ha demostrado su utilidad en el descubrimiento de biomarcadores relacionados con la EII. Sin embargo, hasta ahora ningún estudio ha encontrado predictores
20 proteómicos definitivos de la respuesta primaria a los agentes anti-TNF- α en la EC [7].

La adquisición secuencial en ventana de todos los espectros de masas teóricos (*Sequential Window Acquisition of All Theoretical Fragment Ion Mass Spectra* o “SWATH” por sus siglas en inglés) es uno de los enfoques más prometedores en proteómica. Consiste en utilizar la información disponible en las bibliotecas espectrales de iones fragmento para extraer los
25 mapas completos de iones fragmento generados mediante un método de adquisición de espectrometría de masas independiente de los datos [8].

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se centra en identificar biomarcadores fiables para predecir la **respuesta al tratamiento con fármacos anti-TNF- α** en pacientes con EC.

30 Para ello se haya hecho usode las técnicas de proteómica SWATH.

Se clasificaron 113 pacientes con EC según su respuesta clínica a las 12 semanas de tratamiento con anti-TNF- α como **Remisión a Corto Plazo (RCP)** o **No Remisión a Corto Plazo (NRCP)**. Se compararon los perfiles de expresión proteica de las muestras de plasma en un subconjunto de pacientes de ambos grupos antes de la terapia anti-TNF- α mediante proteómica SWATH.

Se identificaron **18 proteínas plasmáticas expresadas de forma diferencial** ($p \leq 0,01$, *fold change* $\geq 2,4$) implicadas en la organización del citoesqueleto y la unión celular, la hemostasia/función plaquetaria, el metabolismo de los hidratos de carbono y la respuesta inmunitaria como biomarcadores candidatos de la RCP.

- Debe tenerse en cuenta que el citoesqueleto ejerce funciones reguladoras clave en el mantenimiento de las barreras celulares mediante adhesiones célula-célula y célula-matriz, y que la integridad del citoesqueleto es primordial para mantener la integridad de la barrera epitelial del tracto gastrointestinal, una de las primeras barreras físicas contra factores externos, incluido el microbioma intestinal aberrante.
- Entre las **18 proteínas plasmáticas expresadas de forma diferencial** podemos encontrar: **COF1**, un importante factor de actina-polimerización que controla la apertura de las uniones estrechas en la barrera epitelial; **1433Z**, una proteína de unión a cadherinas que interviene en la adhesión entre células; **VINC** o vinculina, una proteína de unión a filamentos de actina que, al igual que **RSU1**, se colocaliza en las adhesiones focales y participa en la adhesión célula-matriz; **GDIR2**, cuyo aumento regula la reorganización del citoesqueleto de actina; **SDPR**, una proteína implicada en la transducción de señales que se ha asociado físicamente con PLEK en las plaquetas; **ACTN1** y **MOES**, que asocian indirectamente a PLEK con la actina; **PLEK**, asociada a la polimerización de actina y a procesos relacionados como la reorganización del citoesqueleto, la agregación plaquetaria, la secreción de gránulos o la diseminación celular; **SDPR** y **MOES**, que participan en diferentes procesos relacionados con la reorganización del citoesqueleto y la biología de las plaquetas, como la endocitosis, la adhesión, la locomoción y la señalización; **S10A4**, proteína relacionada con el citoesqueleto que se amplifica en un microambiente inflamatorio; **GDIB**, asociada con la reducción de la inflamación en el microambiente tumoral y la supresión de metástasis; **GSTO-1**, que interviene en la respuesta inflamatoria. La al-alfa-enolasa; **ENOA**, enzima multifuncional implicada en muchas enfermedades, incluidos los trastornos inflamatorios; **ALDOA** y **TPIS**, proteínas relacionadas con la glucólisis; **TAGL2**, **ZYX** y **PDLI1**.

De entre las 18 proteínas plasmáticas expresadas de forma diferencial anteriormente citadas destaca la **vinculina (VICN)**, que resultó ser una de las proteínas más desreguladas ($p < 0,001$), junto con ENOA. La expresión diferencial de vinculina fue posteriormente confirmada por ELISA ($p = 0,054$).

- 5 La Vinculina (VINC) es una proteína de membrana-citoesqueletica ubicada en las placas de las adhesiones focales e involucrada en el anclaje de las moléculas de integrina al citoesqueleto de actina. Se han descrito tres isoformas de esta molécula en humanos, siendo su secuencia canónica la compuesta por los 1134 aminoácidos que se indican a continuación como **SEQ ID NO.1**:

10 MPVFHTRTIESILEPVAQQISHLVIMHEEGEVDGKAIPDLTAPVAAVQAAVSNLVRVGKETVQ
TTEDQILKRDMPPAFIKVENACTKLVQAAQMLQSDPYSVPARDYLIDGSRGILSGTSDLLLT
DEAEVRKIIRVCKGILEYLTVAEVVETMEDLVITYTKNLGPGMTKMAKMIDERQQELTHQEHR
VMLVNSMNTVKELLPVLISAMKIFVTTKNSKNQGIEEALKNRNFTVEKMSAEINEIIRVLQLTS
WDEDAWASKDTEAMKRALASIDSKLNQAKGWLDRDPSASPGDAGEQAIRQILDEAGKVGEL
15 CAGKERREILGTCKMLGQMTDQVADLRARGQGSSPVAMQKAQQVVSQGLDVLTAQVENAA
RKLEAMTNSKQSIKIDAAQNWLADPNNGGPEGEEQIRGALAEARKIAELCDDPKERDDILR
SLGEISALTSLADLRRQGKGDSPEARALAKQVATALQNLQTKTNRAVANSRPAKAAVHLE
GKIEQAQRWIDNPTVDDRGVGQAAIRGLVAEGHRLANVMMGPYRQDLLAKCDRVDQLTAQ
LADLAARGESESPQARALASQLQDSLKDLKARMQEAMTQEVSDVFSDDTTPIKLLAVAATA
20 PPDAPNREEVFDERAANFENHSGKLGATAEKAAAVGTANKSTVEGIQASVKTARELTPQVV
SAARILLRNPGNQAAEYEHFETMKNQWIDNVEKMTGLVDEAIDTKSLLDASEEAIKKDLKCK
VAMANIQPQMLVAGATSIARRANRILLVAKREVENSEDPKFREAVKAASDELSTISPMVMD
AKAVAGNISDPGLQKSFDSGYRILGAVAKVREAFQPQEPDFPPPPPDLEQLRLTDELAPPK
PPLPEGEVPPPRPPPEEKDEEFPEQKAGEVINQPMMAARQLHDEARKWSSKPGIPAAE
25 VGIGVVAEADAADAAGFPVPPDMEDDYEPHELLMPSNQPVNQPIAAAQSLHREATKWSSK
GNDIAAAKRMALLMAEMSRLVRGGSGTKRALIQCAKDIKASDEVTRLAKEVAKQCTDKRI
RTNLLQVCERIPITISTQLKILSTVKATMLGRTNISDEESEQATEMLVHNAQNLMQSVKETVRE
AEAASIKIRTDAGFTLRWVRKTPWYQ

- La Vinculina (VINC) se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido,
30 que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 1, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

- 5 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 1, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína vinculina.

10 Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) correspondiente al gen VLC, LRG_383, con número NG_008868.1, nombrada como SEQIDNO. 2.

15 En el análisis univariante y multivariante se incluyeron como parámetros a considerar como potenciales biomarcadores predictores de la respuesta a la terapia anti-TNF- α : el Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn (CDAI), la inducción con corticosteroides y la resección intestinal, los niveles plasmáticos de vinculina y los niveles plasmáticos de ENOA.

El índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn (CDAI) clasifica a los pacientes en función de la puntuación obtenida a través del siguiente cuestionario:

20 - El paciente informó un patrón de las heces: Número medio de deposiciones líquidas o blandas al día durante siete días (14 puntos por deposición). Con difenoxilato o loperamida para diarrea (30 puntos).

- Calificación de dolor abdominal promedio durante siete días: Nada (0 puntos), Dolor leve (35 puntos), Dolor moderado (70 puntos), Dolor intenso (105 puntos).

- Bienestar general cada día durante siete días: Bien (0 puntos), Levemente por debajo de lo normal (49 puntos), Malo (98 puntos), Muy malo (147 puntos), Terrible (196 puntos).

25 - Complicaciones: Artritis o artralgia (20 puntos), Iritis o uveítis (20 puntos), Eritema nudoso, pioderma gangrenoso o estomatitis aftosa (20 puntos), Fisura anal, fístula o absceso (20 puntos), Otra fístula (20 puntos), Temperatura por encima de los 100 °F (37,8 °C) en la última semana (20 puntos).

- Hallazgo de una masa abdominal: Sin masa (0 puntos), Masa posible (20 puntos), Masa definitiva (50 puntos).

- Anemia y cambio de peso: Desviación absoluta del hematocrito del 47% en los hombres o del 42% en las mujeres (6 puntos por desviación porcentual). Desviación porcentual del peso estándar (1 punto por cada porcentaje de desviación).

En función de los resultados obtenidos se clasifica como: Remisión asintomática (0 - 149 puntos), Enfermedad de Crohn activa de forma leve a moderada (150 - 220 puntos), Enfermedad de Crohn activa de forma moderada a grave (221 - 450 puntos) y Enfermedad activa de forma grave a fulminante (451 - 1100 puntos).

10 Con inducción con corticosteroides, nos referimos al tratamiento concomitante con corticosteroides, es decir, pacientes a los que simultáneamente se les administra corticosteroides y tratamiento biológico. Suelen ser pacientes con una enfermedad más agresiva.

15 Se valoró la capacidad predictiva de la respuesta a **corto plazo (12 semanas)** medida como **Remisión a Corto Plazo (RCP) o No Remisión a Corto Plazo (NRCP)** del Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn basal (CDAI), la inducción con corticosteroides, la resección intestinal, los niveles plasmáticos de vinculina y de ENOA basales, tanto por separado como en conjunto.

20 También se valoró su capacidad predictiva de la respuesta a **largo plazo (12 meses)** medida como **remisión sostenida (RS)**, agrupando para ello a los pacientes que inicialmente se detectaban como **No Remisión a Corto Plazo (NRCP)** con los que presentaban a largo plazo **pérdida de respuesta (PR)**.

25 A la luz de los resultados obtenidos se proponen a continuación una serie de biomarcadores que permiten la selección de los pacientes con EC candidatos al tratamiento anti-TNF- α , de forma que los fármacos anti-TNF- α se prescriban de forma más segura, eligiendo a aquellos pacientes con mayor probabilidad de respuesta terapéutica.

30 Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere al uso del **Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn basal, la inducción con corticosteroides, la resección intestinal previa y los niveles basales de expresión de vinculina** en muestras aisladas de plasma, solos o en cualquiera de sus combinaciones, como **biomarcadores** para **predecir la respuesta del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α** .

La respuesta a la terapia anti-TNF- α se clasifica como respuesta a **corto plazo**, aquí definido como **12 semanas desde el inicio del tratamiento**, o como respuesta a **largo plazo**, aquí definido como **12 meses desde el inicio del tratamiento**.

5 La respuesta a corto plazo categoriza a los pacientes en aquellos que presentan **Remisión a Corto Plazo (RCP) o No Remisión a Corto Plazo (NRCP)**.

La respuesta a largo plazo categoriza a los pacientes en aquellos que presentan **remisión sostenida (RS)** o no, grupo que incluye a los pacientes con **No Remisión a Corto Plazo (NRCP)** y a los que presentan **pérdida de respuesta (PR)**.

10 Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a un perfil de biomarcadores que comprende Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn basal y/o la inducción con corticosteroides y/o la resección intestinal previa para predecir la respuesta del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α a corto plazo.

15 En una realización preferida de este aspecto de la invención el perfil de biomarcadores comprende todos los biomarcadores mencionados de forma simultánea, y más preferiblemente, además comprende los niveles basales de expresión de vinculina en muestras aisladas de plasma.

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere al uso de ese perfil de biomarcadores para predecir la respuesta a corto plazo del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α .

20 Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere al método de obtención datos útiles para predecir la respuesta a **corto plazo** del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α que comprende obtener el Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn basal y/o determinar si el individuo ha sido sometido a resección intestinal previa y/o determinar si el individuo ha sido sometido a inducción con corticosteroides.

25 En una realización preferida de este aspecto de la invención, se obtienen el Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn basal y se determina si el individuo ha sido sometido a resección intestinal previa y a inducción con corticosteroides, y además se miden los niveles basales de expresión de vinculina en muestras previamente aisladas de plasma, para compararlos posteriormente con los valores obtenidos de una muestra de referencia aislada
30 de individuos con Resmisión a Corto Plazo.

Un **quinto aspecto** de la invención refiere al método *in vitro* para predecir la respuesta a corto plazo del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α que comprende el método de obtención de datos útiles anteriormente descrito, y que además comprende asignar al individuo que presenta un Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn basal mayor de 150 y/o que ha sido sometido a inducción con corticosteroides y/o que ha sido sometido a resección intestinal previa, al grupo de individuos que presenta No Resmisión a Corto Plazo.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, se asigna al individuo que presenta los niveles basales de expresión de vinculina disminuidos respecto al valor de referencia de individuos con Remisión a Corto Plazo, un Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn mayor de 150, y que ha sido sometido a inducción con corticosteroides y a resección intestinal previa, al grupo de individuos que presenta No Remisión a Corto Plazo.

Un **sexto aspecto** de la invención se refiere a un perfil de biomarcadores como biomarcadores para predecir la respuesta a la terapia anti-TNF- α a largo plazo que comprende el índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn y/o la resección intestinal previa.

En una realización preferida de este aspecto de la invención el perfil de biomarcadores comprende todos los biomarcadores mencionados de forma simultánea, y además comprende los niveles basales de expresión de vinculina en muestras aisladas de plasma.

Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere al uso de ese perfil de biomarcadores para predecir la respuesta a largo plazo del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α .

Un **octavo aspecto** de la invención se refiere al método de obtención de datos útiles para predecir la respuesta a **largo plazo** del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α que comprende obtener el Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn y/o determinar si el individuo ha sido sometido a resección intestinal previa.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, se obtienen el Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn basal y se determina si el individuo ha sido sometido a resección intestinal previa, y además comprende medir los niveles de expresión de vinculina en

muestras previamente aisladas de plasma y compararlos con los valores obtenidos de una muestra de referencia aislada de individuos con Respuesta Sostenida.

Un **noveno aspecto** de la invención se refiere a un método *in vitro* para predecir la respuesta a largo plazo del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α que comprende el método de obtención de datos útiles anteriormente descrito, y que además comprende asignar al individuo que presenta un Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn mayor de 150 y/o ha sido sometido a resección intestinal previa, al grupo de individuos que no presenta Respuesta Sostenida.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, se asigna al individuo que presenta un Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn basal mayor de 150 y que ha sido sometido a inducción con corticosteroides y que presenta los niveles de expresión de vinculina disminuidos respecto al valor de referencia de individuos con Respuesta Sostenida, al grupo de individuos que No presenta Respuesta Sostenida.

En el contexto de la presente invención, los términos “niveles basales” o “valores basales” o CDAI “basal” refieren a las medidas y valores tomados de forma previa a iniciar el tratamiento con anti-TNF- α en pacientes EC.

Una “muestra biológica aislada” incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Preferiblemente, la muestra biológica aislada es plasma.

En el contexto de la presente invención, el término “nivel de expresión” o “niveles de expresión” refiere a la cantidad de proteína en plasma detectada mediante ELISA

En el contexto de la presente invención, se entiende por “*muestra de referencia*” la muestra que se usa para determinar la variación de los niveles de expresión de la presente invención. En una realización preferida, el valor de referencia se obtiene de los valores de expresión obtenidos de una muestra con pacientes EC que responden positivamente al tratamiento con anti-TNF- α , bien a corto plazo, es decir, individuos con Resmisión a Corto Plazo, o bien a largo plazo, es decir, individuos con Respuesta Sostenida.

Preferiblemente, se toman muestras de referencia de varios individuos con EC respondedores al tratamiento con anti-TNF- α y se combinan, de modo que el valor de referencia refleje el valor medio de dichas moléculas en la población de individuos

respondedores, bien a corto, bien a largo plazo, al tratamiento con anti-TNF- α . "*Valor de referencia*" es el nivel de expresión de vinculina en una muestra de referencia.

La medida de la cantidad o la concentración de producto de expresión preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa, puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración del producto de expresión, es decir, la proteína. Esta medida está correlacionada directamente con el número de moléculas de ARN. Dicha señal (a la que también podemos referirnos como señal de intensidad) puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de dichos productos. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, "etiqueta" o productos de reacción enzimática).

El término "cantidad", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa de los productos de expresión, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con los mismos o que pueda derivarse de éstos. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de dichos productos de expresión obtenidos mediante medida directa. Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en otra parte del presente documento.

El término "comparación", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación de la cantidad de los productos de expresión de vinculina de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una cantidad de vinculina de una o varias muestras de referencia deseable. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema.

En la invención, el método para determinar los niveles basales de expresión de vinculina en las muestras previamente aisladas de plasma no necesita estar particularmente limitado y puede seleccionarse de entre cualquiera de los disponibles en el estado de la técnica. En una realización preferida, se pueden obtener mediante cualquiera de las siguientes técnicas: SWATH, ELISA o inmunoensayo.

Los niveles de referencia pueden ser determinados mediante la medición de los niveles de expresión, y esos niveles de referencia se pueden ajustar a las poblaciones específicas (por ejemplo, un nivel de referencia puede estar relacionada con la edad, por lo que las comparaciones se puede hacer entre los niveles de expresión en las muestras de los sujetos de una cierta edad y niveles de referencia para una enfermedad particular, el fenotipo, o falta de ella en un determinado grupo de edad). El experto en la técnica apreciará que el tipo de muestra de referencia puede variar dependiendo del método específico a realizar.

El perfil de expresión en la muestra de referencia puede ser generado a partir de una población de dos o más personas. La población, por ejemplo, pueden contener 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más personas.

Una vez que los niveles de expresión en relación con los valores de referencia se han determinado, es necesario identificar si existen alteraciones en la expresión (aumento o disminución de la expresión). La expresión (y los niveles del producto de expresión del gen) se considera aumentada en una muestra de la materia objeto de estudio cuando los niveles de incremento con respecto a la muestra de referencia son al menos de un 5%, por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos el 20%, al menos un 25%, por lo menos 30%, por lo menos el 35%, por lo menos el 40%, por lo menos 45%, por lo menos el 50%, por lo menos el 55%, por lo menos el 60%, por lo menos 65%, por lo menos el 70%, por lo menos el 75%, por lo menos el 80%, por lo menos el 85%, por lo menos el 90%, por lo menos el 95%, por lo menos 100%, por lo menos 110%, por lo menos 120%, por lo menos 130%, por lo menos 140%, por lo menos 150%, o más. Del mismo modo, la expresión se considerada disminuida cuando sus niveles disminuyen con respecto a la muestra de referencia en al menos un 5%, por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos el 20%, por lo menos el 25%, al menos un 30%, por lo menos el 35%, por lo menos el 40%, por lo menos 45%, por lo menos el 50%, por lo menos el 55%, por lo menos el 60%, por lo menos el 65%, por lo menos 70%, por lo menos el 75%, por lo menos el 80%, por lo menos el 85%, por lo menos el 90%, por lo menos el 95%, por lo menos 100% (es decir, ausente).

En el contexto de la presente invención, los términos "sujeto", "paciente" o "individuo" se usan aquí de manera intercambiable para referirse a todos los animales clasificados como mamíferos e incluyen, entre otros, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano de cualquier sexo, edad o raza.

A lo largo de la descripción y reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, complementos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se entenderán en parte a partir de la descripción y en parte a partir de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden limitar la presente invención.

Los términos "uno o más" o "al menos un" o "varios", tal y como se usan en este documento, incluyen uno y la especificación individualizada de cualquier número que sea más de uno, como dos, tres, cuatro, cinco, seis, etc."

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Cuantificación de la concentración plasmática de ENOA y VINC mediante ELISA. El tamaño de la muestra fue de 97 para el grupo de remisión a corto plazo (RCP) y 16 para el grupo sin RCP (NRCP).

Figura 2: Comparación de los niveles plasmáticos de VINC mediante ELISA, entre el subgrupo de pacientes con remisión sostenida (RS) y pérdida de respuesta (PR) y con remisión sostenida (RS) y el grupo NRCP. Significación estadística entre grupos (*).

Figura 3: La curva ROC mostró que el modelo de regresión construido utilizando los niveles plasmáticos de VINC en combinación con parámetros clínico-patológicos para predecir la respuesta a corto plazo del paciente con EC a la terapia con fármacos anti-TNF

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se realizó un estudio multicéntrico, observacional y prospectivo de pacientes con EC que iniciaron tratamiento anti-TNF- α con infliximab, adalimumab o infliximab biosimilar. La elección del agente anti-TNF- α quedó a discreción del médico responsable y los fármacos se prescribieron de acuerdo con la pauta posológica autorizada. El protocolo del estudio se llevó a cabo de acuerdo con los principios éticos contenidos en la Declaración de Helsinki y el protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética Biomédica de Andalucía. Todos los pacientes fueron informados y dieron su consentimiento por escrito para participar.

Población de estudio

Ciento trece pacientes adultos con EC, naïve a fármacos anti-TNF- α y con indicación de terapia anti-TNF- α por actividad clínica, endoscópica o radiológica, fueron reclutados en tres hospitales académicos: Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, España), Hospital Universitario de la Princesa (Madrid, España) y Hospital Universitario de Galdakano (Vizcaya, España).

La respuesta terapéutica se evaluó 12 semanas después del inicio del fármaco anti-TNF- α , y los pacientes se clasificaron como pacientes con **Remisión a Corto Plazo (RCP)** o con **No Remisión a Corto Plazo (NRCP)**. La respuesta primaria del estudio fue la ausencia de respuesta clínica, evaluada según el Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn (CDAI) en la enfermedad luminal, y según la Evaluación del Drenaje de la Fístula en la enfermedad perianal. Los criterios para considerar la ausencia de respuesta fueron CDAI>150; actividad endoscópica o radiológica; drenaje purulento tras una compresión suave con el dedo; nueva fístula; aumento de la dosis; cambio a un fármaco diferente; adición de otros inmunosupresores; cirugía o dilatación endoscópica.

Los pacientes con Remisión a Corto Plazo (RCP) se estratificaron además en pacientes con **remisión sostenida (RS)** y pacientes con **pérdida de respuesta (PR)** tras 12 meses de tratamiento.

Muestras de plasma

Las muestras de plasma se recogieron en los 2 días anteriores a la primera dosis del agente anti-TNF- α en tubos EDTA-K3 de 9 ml (K3E VACUETTE®, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). Todas las muestras se centrifugaron en la primera hora tras la recogida, a 3.000 rpm y 4°C durante 10 min. El plasma se recuperó inmediatamente y se almacenó a -80°C hasta su análisis.

Preparación de la muestra para el análisis cromatografía de líquidos - espectrometría de masas (LC-MS)

El análisis proteómico se realizó en un subconjunto de 20 pacientes seleccionados aleatoriamente y clasificados según el resultado primario del estudio como pacientes RCP (n=16; 8 RS y 8 PR) o pacientes NRCP (n=4).

Las 14 proteínas más abundantes en la sangre se depletaron utilizando el kit Hu-14 Multiple Affinity Removal System (Agilent Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las proteínas no deplecionadas se concentraron utilizando

concentradores de centrifugación de corte de 5.000 pesos moleculares (Agilent Technologies). A continuación, las muestras se limpiaron para eliminar cualquier contaminante mediante precipitación de proteínas con TCA/acetona, y se solubilizaron en 50 µl de RapiGest SF al 0,2% (Waters, Milford, MA, EE.UU.) en bicarbonato amónico 50 mM.

- 5 El contenido total de proteínas se midió utilizando el kit Qubit Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) y 50 µg de proteínas se digirieron con tripsina siguiendo un protocolo adaptado de Vowinckel *et al.* Brevemente, las muestras de proteína se incubaron con 5 mM de ditiotretol a 60°C durante 30 min y después con 10 mM de yodoacetamida a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 30 min. Se añadió tripsina
- 10 modificada de grado de secuenciación (Promega, Madison, WI, EE.UU.) en una proporción de 1:40 tripsina: proteína y se incubó a 37°C durante 2 horas; se volvió a añadir la misma cantidad de tripsina y se incubó a 37°C durante otras 15 horas. A continuación, RapiGest se precipitó por centrifugación tras incubar con ácido trifluoroacético al 0,5% a 37°C durante 1 hora. El volumen final se ajustó con agua mili-Q y acetonitrilo hasta una concentración final
- 15 de 0,5 µg de péptido/µL, 2,25% de acetonitrilo y 0,2% de ácido trifluoroacético.

Creación de la biblioteca espectral

- Para crear las bibliotecas espectrales MS/MS, las soluciones peptídicas se analizaron mediante un enfoque *shotgun* de adquisición dependiente de datos (DDA) utilizando nano-LC-MS/MS. Para obtener una buena representación de los péptidos y proteínas presentes
- 20 en las 20 muestras, se prepararon viales agrupados, que consistían en mezclas equivalentes de las muestras originales. Se separó un µg de cada muestra agrupada (2 µL) en un sistema nano-LC Ekspert nLC415 (Eksigent, Dublín, CA, EE.UU.) utilizando una columna Acclaim PepMap C18 (75 µm x 25 cm, 3 µm, 100 Å) (Thermo Fisher Scientific) a un caudal de 300 nL/min. Como disolventes A y B se utilizaron agua y acetonitrilo, ambos con
- 25 un contenido de ácido fórmico del 0,1%, respectivamente. El gradiente fue del 5% al 30% de B durante 120 minutos, 10 minutos al 90% de B y, por último, 20 minutos al 5% de B para equilibrar la columna, con un tiempo total de 150 minutos.

- Una vez eluidos los péptidos, se inyectaron directamente en un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo-TOF Triple TOF 5600+ (Sciex, Redwood City, CA, EE.UU.), operado con
- 30 un sistema de adquisición dependiente de datos "top 65" en modo de iones positivos. Se utilizó una fuente ESI NanoSpray III (Sciex) para la interfaz entre nLC y MS, con una aplicación de voltaje de 2.600 V. El modo de adquisición consistió en un barrido MS de sondeo de 250 ms de 350 a 1.250 m/z, seguido de un barrido MS/MS de 230 a 1.700 m/z

(tiempo de adquisición de 60 ms, energía de colisión rodante) de los 65 iones precursores superiores del barrido de sondeo, para un tiempo de ciclo total de 4,2 s. La fragmentación de los iones precursores en el barrido de sondeo de 250 ms se realizó en un tiempo de ciclo de 4,2 s. El tiempo de ciclo total fue de 1,5 s. A continuación, los precursores fragmentados se añadieron a una lista de exclusión dinámica durante 15 s. Todos los iones con carga única se excluyeron del análisis MS/MS.

Las identificaciones de péptidos y proteínas se realizaron utilizando el software Protein Pilot (versión 5.0.1, Sciex) con una base de datos humana Swiss-Prot concatenated target-reverse decoy (descargada en marzo de 2016), que contiene 20.200 secuencias de proteínas diana, especificando yodoacetamida como alquilación de Cys. La tasa de falsos descubrimientos (FDR) se fijó en 0,01 tanto para los péptidos como para las proteínas. A continuación, se utilizaron los espectros MS/MS de los péptidos identificados para generar la biblioteca espectral para la extracción de picos SWATH utilizando el complemento para el software PeakView (versión 2.1, Sciex) MS/MSALL with SWATH Acquisition MicroApp (versión 2.0, Sciex). Los péptidos con una puntuación de confianza superior al 99% (obtenida a partir de la búsqueda en la base de datos Protein Pilot) se incluyeron en la biblioteca espectral.

Cuantificación relativa mediante adquisición SWATH

Las muestras individuales se analizaron utilizando un método de Adquisición Independiente de Datos (DIA). Cada muestra (2 µL) se analizó utilizando el equipo LC-MS y el gradiente LC descritos anteriormente para construir la biblioteca espectral en lugar de utilizar el método de adquisición SWATH-MS. El método consistió en repetir un ciclo con 60 barridos TOF MS/MS (300 a 1.600 m/z, modo de alta sensibilidad, tiempo de adquisición de 90 ms) de ventanas secuenciales de aislamiento de precursores solapadas de anchura variable (solapamiento de 1 m/z) que cubrían el intervalo de masas de 350 a 1.250 m/z con un barrido TOF MS previo (350 a 1.250 m/z, tiempo de adquisición de 50 ms) para cada ciclo. La duración total del ciclo fue de 5,5 s. La anchura de las 60 ventanas variables se optimizó en función de la densidad de iones encontrada en los análisis DDA previos utilizando una hoja de cálculo de ventanas variables SWATH de Sciex.

Análisis de datos SWATH

La extracción selectiva de datos de las trazas de cromatogramas de iones fragmento de las series SWATH se realizó con PeakView (versión 2.1) utilizando la microaplicación

MS/MSALL con SWATH Acquisition (versión 2.0). Esta aplicación procesó los datos utilizando la biblioteca espectral creada a partir de los datos *shotgun*. Se seleccionaron hasta 10 péptidos por proteína y 12 fragmentos por péptido, basándose en la intensidad de la señal; los péptidos compartidos y modificados se excluyeron del procesamiento. Se utilizaron ventanas de diez minutos y anchuras de 20 ppm para extraer los cromatogramas de iones; se intentó la cuantificación SWATH para todas las proteínas de la biblioteca de iones que fueron identificadas por ProteinPilot con un FDR inferior al 1%. Los tiempos de retención de los péptidos que se seleccionaron para cada proteína se realinearon en cada corrida de acuerdo con 118 péptidos endógenos de la Apolipoproteína B-100, eluidos a lo largo de todo el eje temporal. A continuación, se generaron los cromatogramas de iones extraídos para cada ion fragmento seleccionado; las áreas de pico de los péptidos se obtuvieron sumando las áreas de pico de los iones fragmento correspondientes. PeakView calculó un FDR y una puntuación para cada péptido asignado según los componentes cromatográficos y espectrales; sólo los péptidos con un FDR inferior al 1% se utilizaron para la cuantificación de proteínas. La cuantificación de proteínas se calculó sumando las áreas de pico de los péptidos correspondientes. Se utilizó MarkerView (versión 1.2.1, Sciex) para la normalización de la señal; la abundancia diferencial se comprobó aplicando la prueba T a nivel de proteína, utilizando SPSS versión 25.0 (IBM, Chicago, IL, EE.UU.).

Análisis de rutas funcionales

Las rutas funcionales de los biomarcadores candidatos identificados se analizaron mediante DAVID Bioinformatics Resources 6.7.

Ensayo inmunoenzimático

Se utilizó la prueba ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para cuantificar la concentración proteica de alfa-enolasa humana (ENOA) (Abnova, Taipei, Taiwán) y vinculina (VINC) (Antibodies-online, Aachen, Alemania) en muestras de plasma de 113 pacientes (97 RCP y 16 NRCP). El ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante y los datos obtenidos se utilizaron para validar los resultados de la proteómica.

Análisis estadístico

Las variables categóricas se presentaron en tablas de frecuencias, mientras que las continuas se expresaron como media y desviación estándar o como mediana y rango intercuartílico (RIQ) para las que presentaban una distribución asimétrica. Se utilizó la

prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la normalidad de la distribución. Se utilizó la prueba de Chi cuadrado para las frecuencias, la prueba T de Student o ANOVA para las variables cuantitativas con distribución normal, y la prueba U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis para las distribuciones asimétricas. Un valor p inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo. Todos los análisis se realizaron con el programa SPSS versión 25.0.

Estudio descriptivo y predictores clínicos de remisión a corto plazo

Ciento trece pacientes fueron analizados clínicamente para determinar su respuesta clínica a corto plazo al tratamiento anti-TNF- α . De ellos, el 85,8% de los pacientes presentaron RCP y el 14,2% NRCPS. La **Tabla 1** muestra las características basales de los pacientes según la respuesta clínica al tratamiento.

Tabla 1. Relación entre las características demográficas y clínicas y la respuesta de los pacientes al tratamiento anti-TNF- α . Análisis univariante para pacientes con remisión a corto plazo (RCP) y pacientes sin RCP (NRCP).

Variable	Valores omitidos	Análisis univariante			
		NRCP (16)	RCP (97)	RM (95% IC)	p
Sexo (% hombres)	-	11 (68.8%)	53 (54.6%)	0.5 (0.2-1.7)	0.296
Edad (años, mediana, RIQ)	-	53.5 (43.0-59.3)	39.0 (27.5-50.0)	1.1 (1.0-1.1)	0.009*
Fumadores (%)	8 (7.1%)				
No		9 (69.2%)	46 (50.0%)	1 (Ref.)	
Si		4 (30.8%)	32 (34.8%)	0.6 (0.2-2.3)	0.486
Ex fumadores		0 (0.0%)	14 (15.2%)	0.0 (0.0-)	0.999
Anti-TNF	-				
Infliximab/Biosimilar (%)		9 (56.3%)	48 (49.5%)	1 (Ref.)	
Adalimumab (%)		7 (43.8%)	49 (50.5%)	0.8 (0.3-2.2)	0.617
Tratamiento indicado	-				
Enfermedad Luminal (%)		15 (93.8%)	84 (86.6%)	1 (Ref.)	
Enfermedad Perianal (%)		1 (6.3%)	8 (8.2%)	0.7 (0.1-6.0)	0.745
Ambos (%)		0 (0.0%)	5 (5.2%)	0.0 (0.0-)	0.999
Terapia Inmunomodulatoria	-				
Ninguna (%)		2 (12.5%)	17 (17.5%)	1 (Ref.)	
Azathioprina (%)		13 (81.3%)	74 (76.3%)	1.5 (0.3-7.2)	0.619

Methotrexato (%)		0 (0.0%)	3 (3.1%)	0.0 (0.0-)	0.999
Otras (%)		1 (6.3%)	3 (3.1%)	2.8 (0.2-42.0)	0.449
Inducción corticosteroidea (si, %)	-	8 (50.0%)	16 (16.5%)	5.1 (1.7-15.5)	0.004*
IMC Basal (Kg/m ²) (mediana, RIQ)	10 (8.8%)	23.0 (20.8-24.9)	22.4 (20.5-26.0)	1.0 (0.8-1.1)	0.838
Duración Enfermedad (años, mediana, RIQ)	8 (7.1%)	22.0 (2.5-26.0)	4.0 (1.0-13.0)	1.1 (1.0-1.2)	0.006*
Montreal (edad de diagnóstico)	11 (9.7%)				
<17 (%)		0 (0.0%)	7 (7.8%)	1 (Ref.)	
17-40 (%)		9 (75.0%)	64 (71.1%)	2.3x10 ⁸ (0.0-)	0.999
>40 (%)		3 (25.0%)	19 (21.1%)	2.6x10 ⁸ (0.0-)	0.999
Montreal localización	3 (2.7%)				
Ileaca (%)		8 (53.3%)	39 (41.1%)	1 (Ref.)	
Colónica (%)		1 (6.7%)	16 (16.8%)	0.3 (0.0-2.6)	0.281
Ileocolónica (%)		6 (40.0%)	37 (38.9%)	0.8 (0.3-2.5)	0.689
Enfermedad Superior Aislada (%)		0 (0.0%)	3 (3.2%)	0.0 (0.0-)	0.999
Comportamiento	8 (7.1%)				
Inflamatorio (%)		5 (38.5%)	56 (60.9%)	1 (Ref.)	
Estenosante (%)		1 (7.7%)	16 (17.4%)	0.7 (0.1-6.4)	0.753
Fistulizante (%)		7 (53.8%)	18 (19.6%)	4.4 (1.2-15.4)	0.023*
Estenosante y Fistulizante (%)		0 (0.0%)	2 (2.2%)	0.0 (0.0-)	0.999
Enfermedad Perianal (si, %)	1 (0.9%)	2 (12.5%)	32 (33.3%)	0.3 (0.1-1.3)	0.111
Manifestación Extraintestinal (si, %)	8 (7.1%)	2 (15.4%)	14 (15.2%)	1.0 (0.2-5.1)	0.987
Apendicectomía (si, %)	8 (7.1%)	1 (7.7%)	8 (8.7%)	0.9 (0.1-7.6)	0.904
Resección intestinal (si, %)	-	10 (62.5%)	20 (20.6%)	6.4 (2.1-19.8)	0.001*
Cirugía Perianal (si, %)	-	0 (0.0%)	18 (18.6%)	0.0 (0.0-)	0.998
Basal índice CDAI (AU, mediana, RIQ)	-	235.5 (149.3-310.0)	91.2 (54.9-166.0)	1.0 (1.0-1.0)	0.000*
Hemoglobina Basal (g/L, media ± DS)	9 (8.0%)	12.7 ± 1.0	13.0 ± 1.5	0.8 (0.6-1.3)	0.384
CMB Basal (10 ³ /□L, mediana, RIQ)	9 (8.0%)	7.5 (5.5-11.7)	7.6 (5.6-10.4)	1.1 (0.9-1.2)	0.561
Plaquetas Basal (10 ³ /□L, mediana, RIQ)	10 (8.8%)	304.0 (223.0-356.5)	312.5 (263.5-363.5)	1.0 (1.0-1.0)	0.235

Albumina Basal (g/dL, media $\pm$ DS)	22 (19.5%)	4.0 $\pm$ 0.4	4.0 $\pm$ 0.5	0.9 (0.2-3.8)	0.940
Ferritina Basal (ng/mL, mediana, RIQ)	19 (16.8%)	119.5 (51.2-187.3)	55.0 (26.0-114.9)	1.0 (1.0-1.0)	0.449
PCR Basal (mg/L, mediana, RIQ)	14 (12.4%)	2.3 (0.6-3.4)	4.4 (0.6-14.6)	1.0 (0.9-1.0)	0.253
VSG Basal (mm/h, mediana, RIQ)	34 (30.1%)	35.0 (10.8-85.8)	27.0 (11.0-37.0)	1.0 (1.0-1.0)	0.121
ENOA Basal (μ g/mg proteína)	1 (0.9%)	0.1 (0.0-0.2)	0.1 (0.0-0.2)	0.1 (0.0-4.7)	0.199
VINC Basal (pg/mg proteína)	-	0.8 (0.2-1.2)	1.2 (0.6-2.0)	0.7 (0.4-1.2)	0.171

* IMC: índice de masa corporal; CDAl: índice de actividad de la enfermedad de Crohn; CMB: leucocitos; PCR: proteína C reactiva; VSG: velocidad de sedimentación globular; ENOA: alfa-enolasa; VINC: vinculina; RM: razón de momios, razón de oportunidades o razón de probabilidades; IC: intervalo de confianza.

En cuanto al agente anti-TNF- α prescrito, el 50,4% fueron tratados con infliximab o biosimilar, y el 49,6% recibieron adalimumab, sin diferencias estadísticas en cuanto a la respuesta terapéutica. L

Los pacientes más jóvenes (NRCP: 53,5 (43,0-59,3) años frente a RCP: 39,0 (27,5-50,0) años, $p=0,005$) y con un diagnóstico más reciente de EC (NRCP: 22,0 (2,5-26,0) frente a RCP: 4,0 (1,0-13,0), $p=0,021$), tenían más probabilidades de presentar una RCP a los fármacos anti-TNF- α .

Por el contrario, la inducción con corticosteroides (NRCP: 50,0% vs. RCP: 16,5%, $p=0,006$), la resección intestinal previa (NRCP: 62,5% vs. RCP: 20,6%, $p=0,001$) y CDAl elevado al inicio (NRCP: 235,5 (149,3-310,0) vs. RCP: 91,2 (54,9-166,0), $p=0,000$) se asociaron positivamente con la NRCP (**Tabla 1**).

Marcadores proteómicos de la remisión a corto plazo (RCP)

Se cuantificaron 300 proteínas plasmáticas en el análisis proteómico. Como biomarcadores potenciales de la respuesta primaria identificamos 18 proteínas expresadas diferencialmente ($p \leq 0,009$ y cambio de pliegue $\geq 2,4$): ENOA, VINC, PDZ y LIM dominio proteína 1 (PDLI1), Rho GDP-inhibidor de la disociación 2 (GDIR2), Zyxin (ZYG), Fructosa-bisfosfato aldolasa A (ALDOA), Moesin (MOES), Glutación S-transferasa omega-1 (GSTO-1), Al-fa-actinina-1

(ACTN1), Transgelina-2 (TAGL2), Proteína 2 asociada a la proteína de respuesta a la privación de suero/Caveolae (SDPR), Inhibidor beta de la disociación de Rab GDP (GDIB), Cofilina-1 (COF1), Proteína S100-A4 (S10A4), Proteína supresora de Ras 1 (RSU1), Pleckstrin (PLEK), Proteína 14-3-3 zeta/delta (1433Z) y Triosafofato isomerasa (TPIS) (Tabla 2).

El análisis de las vías funcionales mostró que 17 de estas 18 proteínas identificadas están reguladas por la acetilación. Además, 14 de estos biomarcadores potenciales de respuesta al anti-TNF- α participan en la hemostasia/función plaquetaria (VINC, ALDOA, MOES, ACTN1, TAGL2, SDPR, COF1 y PLEK) y/o intervienen en la organización del citoesqueleto y/o la adhesión celular (VINC, PDLI1, GDIR2, ZYX, ALDOA, MOES, ACTN1, TAGL2, SDPR, COF1, S10A4, RSU1, PLEK y 1433Z), 3 de ellas están relacionadas con la respuesta inflamatoria (GSTO1, GDIB y S10A4) y 3 proteínas están implicadas en el proceso glucolítico (ENOA, ALDOA y TPIS).

Tabla 2. Proteínas expresadas diferencialmente identificadas en muestras de plasma de pacientes con enfermedad de Crohn con RCP a anti-TNF- α . Significación estadística mediante prueba t ($p \leq 0,01$).

ID Proteína	Proteína	p	Fold change	Proceso biológico	Función molecular
P06733	ENOA	0,0001	3,9	Glucólisis / Activación del plasminógeno / Regulación de la transcripción	Unión al ADN / Liasa / Represor
P18206	VINC	0,0007	4,6	Adhesión celular/Citoesqueleto; Hemostasis/Función plaquetaria	Unión a la actina
O00151	PDLI1	0,0013	2,4	Adhesión celular/Citoesqueleto	Unión a la actina
P52566	GDIR2	0,0013	4,9	Adhesión celular/Citoesqueleto	Actividad GTPasa
Q15942	ZYX	0,0014	5,5	Adhesión celular/Citoesqueleto	Unión a metales / Unión a ARN
P04075	ALDOA	0,0021	3,3	Glucólisis; Adhesión celular/Citoesqueleto; Hemostasis/Función plaquetaria	Unión a la actina / Actividad fructosa-bisfosfato aldolasa
P26038	MOES	0,0023	2,5	Adhesión celular/Citoesqueleto; Hemostasis/Función plaquetaria	Unión a la actina
P78417	GSTO1	0,0025	3,2	Respuesta inflamatoria	Oxidoreductasa /

					Transferasa
P12814	ACTN1	0,0025	3,2	Adhesión celular/Citoesqueleto; Hemostasis/Función plaquetaria	Unión a la actina
P37802	TAGL2	0,0027	6,4	Adhesión celular/Citoesqueleto; Hemostasis/Función plaquetaria	Unión a caderina
O95810	SDPR	0,0027	4,2	Adhesión celular/Citoesqueleto; Hemostasis/Función plaquetaria	Unión a lípido
P50395	GDIB	0,0028	3,0	Respuesta inflamatoria	Activación GTPasa
P23528	COF1	0,0029	3,0	Adhesión celular/Citoesqueleto; Hemostasis/Función plaquetaria	Unión a la actina
P26447	S10A4	0,0031	3,3	Adhesión celular/Citoesqueleto; Respuesta inflamatoria	Unión a la actina
Q15404	RSU1	0,0037	3,9	Adhesión celular/Citoesqueleto	Regulación positiva de la actividad GTPasa
P08567	PLEK	0,0048	5,7	Adhesión celular/Citoesqueleto; Hemostasis/Función plaquetaria	Unión a proteína
P63104	1433Z	0,0078	4,2	Adhesión celular/Citoesqueleto	Unión a proteína
P60174	TPIS	0,0093	3,6	Glucólisis	Isomerasa / Liasa

Validación de ENOA y VINC como marcadores potenciales de remisión a corto plazo

ENOA y VINC fueron seleccionadas para realizar la validación de los resultados proteómicos mediante pruebas ELISA, debido a su mayor nivel de significación (**Tabla 2**).

- Según ELISA, ambas proteínas mostraron un aumento no significativo en las muestras de plasma de los pacientes con RCP (**Figura 1 A y B**). Sin embargo, en el caso de VINC, la expresión diferencial rozó la significación estadística (NRCP: 0,8 (0,2-1,2) vs. RCP: 1,2 (0,6-2,0), $p=0,054$) (**Figura 1B**).

- Posteriormente, los pacientes del grupo RCP se estratificaron en pacientes con RS (Respuesta Sostenida) y pacientes con PR (Pérdida de Respuesta) tras 12 meses de tratamiento. En la comparativa de los valores obtenidos, encontramos diferencias

significativas en los niveles plasmáticos de VINC entre los grupos de RS (1.3 (0.8-2.1)) y PR (0.7 (0.2-1.8)) ($p=0.019$), y entre RS y NRCP (0.8 (0.2-1.2)) ($p=0.014$) (**Figura 2A**). Estas diferencias concordaban con los resultados anteriores obtenidos en el análisis proteómico para VINC solo para los grupos RS (492127.1 ± 219002.2) y NRCP (106569.3 ± 65803.9) ($p=0.001$) (**Figura 2B**).

Valoración del pronóstico de pacientes con EC sometidos a terapia anti-TNF- α a corto plazo

A continuación, se evaluó el valor pronóstico de los parámetros clínicos y patológicos para predecir la respuesta del paciente al tratamiento anti-TNF- α . Edad [RM: 1,1 (1,0-1,1), $p=0,009$], duración de la enfermedad [RM: 1,1 (1,0-1,2), $p=0,006$], inducción con corticosteroides [RM: 5,1 (1,7-15,5), $p=0.004$] y principalmente, la resección intestinal [RM: 6,4 (2,1-19,8), $p=0,001$] y la puntuación CDAI basal [RM: 1,0 (1,0-1,0), $p=0,000$], fueron factores independientes de NRCP (**Tabla 1**).

En un análisis multivariante, la inducción con corticosteroides [RM: 8,6 (1,7-43,5), $p=0,009$], la resección intestinal [RM: 10,5 (2,1-52,0), $p=0,004$] y la puntuación basal del CDAI [RM: 1,0 (1,0-1,0), $p=0,003$] fueron factores predictores de NRCP. La inclusión de los niveles basales de VINC en el análisis aumentó la capacidad predictiva del modelo (**Tabla 3**).

Tabla 3. Análisis multivariante para predecir NRCP al tratamiento anti-TNF- α en EC.

Variable	Análisis Multivariate					
	sin VINC /ENOA		con ENOA		con VINC	
	RM (95% IC)	p	RM (95% IC)	p	RM (95% IC)	p
Edad (años)	-	-	-	-	-	-
Inducción con corticosteroides (%)	8.6 (1.7-43.5)	0.009	12.8 (2.4-68.8)	0.003*	14.3 (2.6-77.7)	0.002
Duración enfermedad (años)	-	-	-	-	-	-
Resección del intestino (%)	10.5 (2.1-52.0)	0.004	13.2 (2.5-68.9)	0.002*	14.8 (2.8-78.0)	0.001
Índice CDAI Basal (AU)	1.0 (1.0-1.0)	0.003	1.0 (1.0-1.0)	0.001*	1.0 (1.0-1.0)	0.002
ENOA Basal (pg/mg proteína)	x	x	0.0 (0.0-1.7)	0.067	x	x
VINC Basal (pg/mg proteína)	x	x	x	x	0.5 (0.3-0.9)	0.032

Se obtuvo una muy buena capacidad discriminante del modelo ajustado que incluye la inducción con corticosteroides, la resección intestinal y la puntuación basal del CDAI, sin los niveles basales de VINC [AUC (IC 95%) = 0,904 (0,838-0,970)]. Los resultados fueron e incluso mejores incluyendo los niveles basales de [AUC (IC 95%) = 0,919 (0,862-0,977)] (Tabla 4 y Figura 3).

Tabla 4. Área Bajo Curva - Característica Operativa del Receptor (AUC-ROC) de los modelos multivariantes de la figura 3. La tabla muestra la comparación del AUC-ROC obtenido para los parámetros individuales incluidos en el modelo ajustado y para su combinación con o sin vinculina.

Variable	AUC-ROC	p	95% IC
VINC Basal (pg/mg)	0,651	.054	(0.500-0.802)
Inducción con corticosteroides	0,668	.032	(0.511-0.824)
Resección del intestino	0,709	.007	(0.562-0.857)
Índice CDAI	0,829	.000	(0.718-0.940)
Modelo ajustado (sin VINC)	0,904	.000	(0.838-0.970)
Modelo ajustado (con VINC)	0,919	.000	(0.862-0.977)

Valoración del pronóstico de pacientes con EC sometidos a terapia anti-TNF- α a largo plazo

Una vez transcurridos 12 meses desde el inicio del tratamiento con anti-TNF- α se rehacen los grupos con el fin de comparar el grupo de RS (respuesta sostenida a los 12 meses, n=75) frente al nuevo grupo formado por PR (pérdida de respuesta a los 12 meses) y NRCP (no respuesta a corto plazo) (n=38).

Se detecta que existen diferencias significativas entre ambos grupos tanto para VINC (p=0,002) como para ENOA (p=0,031) (Tabla 5), cuando en la respuesta a corto plazo, solo VINC rozaba la significación estadística (Figura 1B).

Tabla 5. Valores de expresión de VINC y ENOA para los grupos de respuesta a anti-TNF- α a largo plazo. Se muestran los valores de la mediana y rango intercuartílico.

Grupo	VINC	ENOA
RS	1,3 (0,8-2,1)	0,1 (0,0-0,2)
PR + NRCP	0,8 (0,2-1,5)	0,1 (0,0-0,1)

En el modelo univariante, tanto la resección intestinal (2,6 (1,1-6,2), $p=0,029$) como el CDAI basal (1,0 (1,0-1,0), $p=0,011$) y los niveles de expresión de VINC basales (0,7 (0,5-1,0), $p=0,038$), serían predictores de respuesta por sí solos, a diferencia del modelo anterior donde VINC no era predictor por sí solo, pero sí la Inducción con corticoides, que ahora no lo es (1,2 (0,5-3,2), $p=0,651$).

En el modelo multivariante, VINC (0,7 (0,5-1,0), $p=0,031$) agregaría valor predictivo al modelo compuesto por la resección intestinal (2,9 (1,1-7,6), $p=0,026$) y la puntuación basal del CDAI (1,0 (1,0-1,0), $p=0,040$) como factores predictores de respuesta sostenida a los 12 meses. La capacidad discriminante del modelo ajustado que incluye resección intestinal, puntuación basal del CDAI y los niveles de expresión de VINC basales, fue significativa estadísticamente aunque discreta [AUC (IC 95%) = 0,696 (0,592-0,800)] (**Tabla 6**).

Aunque sí que hay diferencias significativas para la ENOA entre los grupos (**Tabla 5**) en este nuevo agrupamiento, no tiene valor predictivo de respuesta.

Tabla 6. Área Bajo Curva - Característica Operativa del Receptor (AUC-ROC) del modelo multivariante propuesto para la respuesta a tratamiento valorada a largo plazo. La tabla muestra la comparación del AUC-ROC obtenido para los parámetros individuales incluidos en el modelo ajustado.

Variable	AUC-ROC	p	95% IC
Resección intestinal	0,597	0,092	0,483-0,711
Índice CDAI	0,660	0,006*	0,549-0,771
VINC Basal (pg/mg)	0,678	0,002*	0,567-0,789
Modelo ajustado	0,696	0,001*	0,592-0,800

Referencias

1. Danese, S.; Fiocchi, C. Etiopathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *World J Gastroenterol* 2006, 12, 4807–4812, doi:10.3748/wjg.v12.i30.4807.
2. Abraham, B.P.; Ahmed, T.; Ali, T. Inflammatory Bowel Disease: Pathophysiology and
5 Current Therapeutic Approaches. *Handb Exp Pharmacol* 2017, 239, 115–146, doi:10.1007/164_2016_122.
3. Gomollón, F.; Dignass, A.; Annese, V.; Tilg, H.; Van Assche, G.; Lindsay, J.O.; Peyrin-Biroulet, L.; Cullen, G.J.; Daperno, M.; Kucharzik, T.; et al. 3rd European Evidence-Based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1:
10 Diagnosis and Medical Management. *Journal of Crohn's and Colitis* 2017, 11, 3–25, doi:10.1093/ecco-jcc/jjw168.
4. Gisbert, J.P.; Panés, J. Loss of Response and Requirement of Infliximab Dose Intensification in Crohn's Disease: A Review. *Am J Gastroenterol* 2009, 104, 760–767, doi:10.1038/ajg.2008.88.
5. Ben-Horin, S.; Kopylov, U.; Chowers, Y. Optimizing Anti-TNF Treatments in Inflammatory Bowel Disease. *Autoimmunity Reviews* 2014, 13, 24–30, doi:10.1016/j.autrev.2013.06.002.
6. Stevens, T.W.; Matheeuwsen, M.; Lönnkvist, M.H.; Parker, C.E.; Wildenberg, M.E.; Gecse, K.B.; D'Haens, G.R. Systematic Review: Predictive Biomarkers of Therapeutic
20 Response in Inflammatory Bowel Disease-Personalised Medicine in Its Infancy. *Aliment Pharmacol Ther* 2018, 48, 1213–1231, doi:10.1111/apt.15033.
7. Gisbert, J.P.; Chaparro, M. Predictors of Primary Response to Biologic Treatment [Anti-TNF, Vedolizumab, and Ustekinumab] in Patients With Inflammatory Bowel Disease: From Basic Science to Clinical Practice. *Journal of Crohn's and Colitis* 2020, 14, 694–709,
25 doi:10.1093/ecco-jcc/jjz195.
8. Gillet, L.C.; Navarro, P.; Tate, S.; Röst, H.; Selevsek, N.; Reiter, L.; Bonner, R.; Aebersold, R. Targeted Data Extraction of the MS/MS Spectra Generated by Data-Independent Acquisition: A New Concept for Consistent and Accurate Proteome Analysis. *Mol Cell Proteomics* 2012, 11, O111.016717, doi:10.1074/mcp.O111.016717.

REIVINDICACIONES

1. Uso del Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn basal, la inducción con corticosteroides, la resección intestinal previa y los niveles basales de expresión de vinculina en muestras aisladas de plasma, solos o en cualquiera de sus combinaciones, como biomarcadores para predecir la respuesta del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α .
5
2. Perfil de biomarcadores para predecir la respuesta a corto plazo del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α que comprende el Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn basal, la inducción con corticosteroides y la resección intestinal previa, de forma individual o simultánea.
10
3. Perfil de biomarcadores según la reivindicación anterior que comprende todos los marcadores de forma simultánea, y además comprende los niveles basales de expresión de vinculina en muestras aisladas de plasma.
4. Uso del perfil de biomarcadores según cualquiera de la reivindicaciones 2 o 3 para predecir la respuesta a corto plazo del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α .
15
5. Un método de obtención datos útiles para predecir la respuesta a corto plazo del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α que comprende:
 - a) obtener el Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn basal y/o
 - 20 b) determinar si el individuo ha sido sometido a resección intestinal previa y/o
 - c) determinar si el individuo ha sido sometido a inducción con corticosteroides.
6. El método de obtención datos útiles para predecir la respuesta a corto plazo del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α que comprende los pasos a), b) y c) de la reivindicación anterior, y que además comprende medir los niveles basales de expresión de vinculina en muestras previamente aisladas de plasma y compararlos con los valores obtenidos de una muestra de referencia aislada de individuos con Resmisión a Corto Plazo.
25
7. Un método *in vitro* para predecir la respuesta a corto plazo del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α que comprende el método de obtención de

datos utiles según la reivindicación 5, y que además comprende asignar al individuo que presenta un Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn basal mayor de 150 y/o ha sido sometido a inducción con corticosteroides y/o a resección intestinal previa, al grupo de individuos que presenta No Resmisión a Corto Plazo.

5 8. El método *in vitro* para predecir la respuesta a corto plazo del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α que comprende el método de obtención de datos utiles según la reivindicación 6, y que además comprende asignar al individuo que presenta los niveles basales de expresión de vinculina disminuidos respecto al valor de referencia de individuos con Remisión a Corto Plazo, un Índice de Actividad de la
10 Enfermedad de Crohn mayor de 150, y que ha sido sometido a inducción con corticosteroides y a resección intestinal previa, al grupo de individuos que presenta No Remisión a Corto Plazo.

9. Perfil de biomarcadores para predecir la respuesta a largo plazo del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α que comprende el índice de Actividad de la
15 Enfermedad de Crohn basal y/o la resección intestinal previa.

10. Perfil de biomarcadores según la reivindicación anterior que comprende todos los marcadores de forma simultanea, y además comprende los niveles basales de expresión de vinculina en muestras aisladas de plasma.

11. Uso del perfil de biomarcadores según cualquiera de la reivindicaciones 9 o 10 para
20 predecir la respuesta a largo plazo del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α .

12. Un método de obtención datos útiles para predecir la respuesta a largo plazo del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α que comprende:

a) obtener Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn y/o

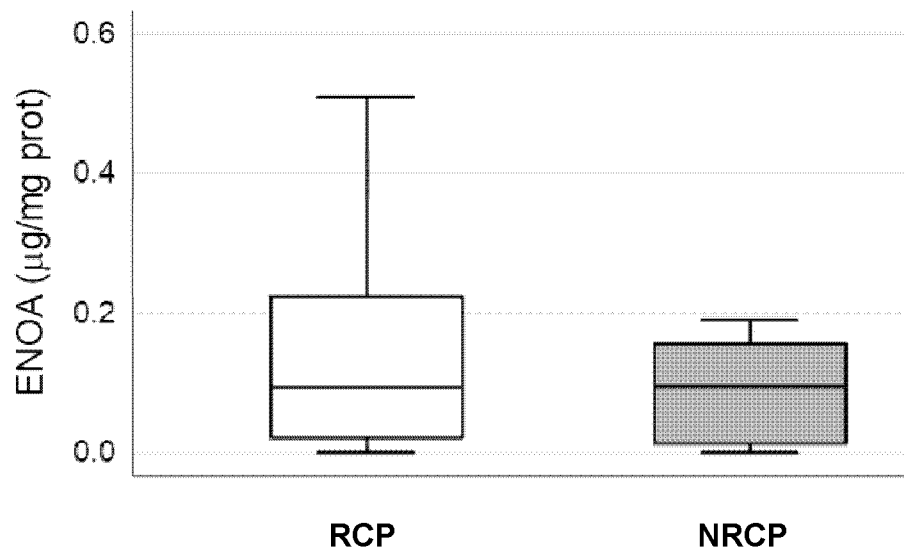
25 b) determinar si el individuo ha sido sometido resección intestinal previa.

13. El método de obtención datos útiles para predecir la respuesta del paciente a largo plazo de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α que comprende los pasos a) y b) de la reivindicación 12 y además comprende medir los niveles expresión de vinculina en muestras previamente aisladas de plasma y compararlos con los valores obtenidos de una
30 muestra de referencia de aislada de individuos con Respuesta Sostenida.

14. Un método *in vitro* para predecir la respuesta a largo plazo del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α que comprende el método de obtención de datos útiles según la reivindicación 12, y que además comprende asignar al individuo que presenta un Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn mayor de 150 y/o ha sido sometido a resección intestinal previa, al grupo de individuos que no presenta Respuesta Sostenida.

15. El método *in vitro* para predecir la respuesta a largo plazo del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF- α que comprende el método de obtención de datos útiles según la reivindicación 13, y que además comprende asignar al individuo que presenta un Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn basal mayor de 150 y ha sido sometido a inducción con corticosteroides y que presenta los niveles de expresión de vinculina disminuidos respecto al valor de referencia de individuos con Respuesta Sostenida, al grupo de individuos que No presenta Respuesta Sostenida.

A



B

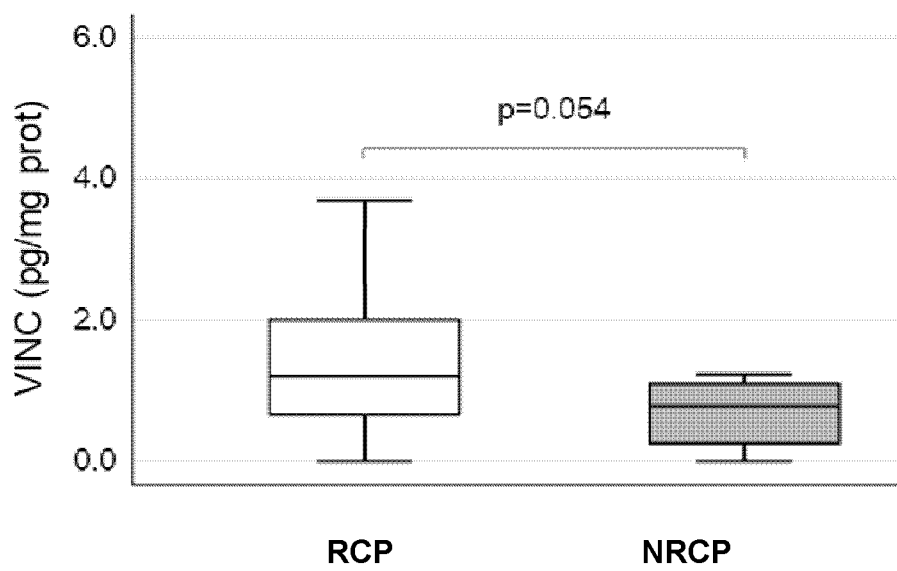
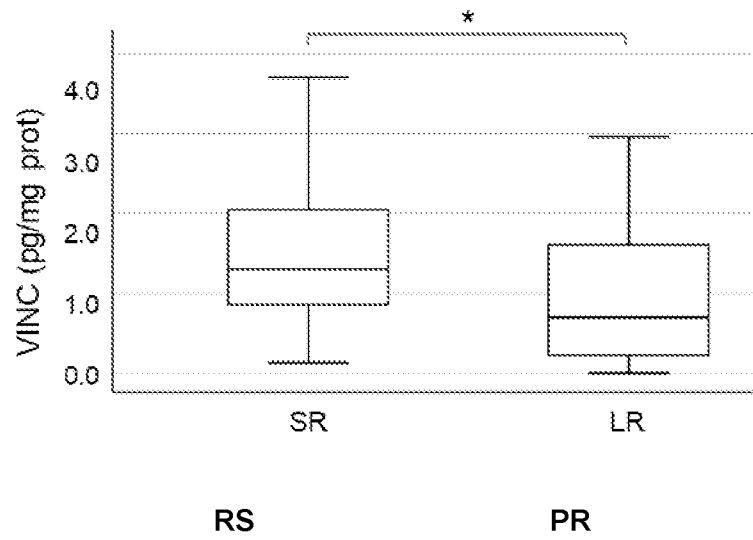


FIG. 1

A



B

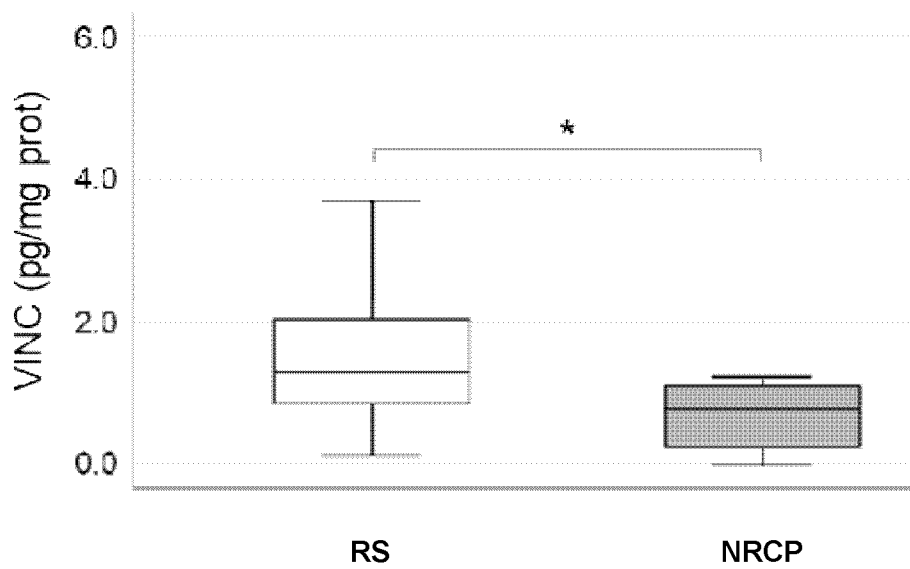


FIG. 2

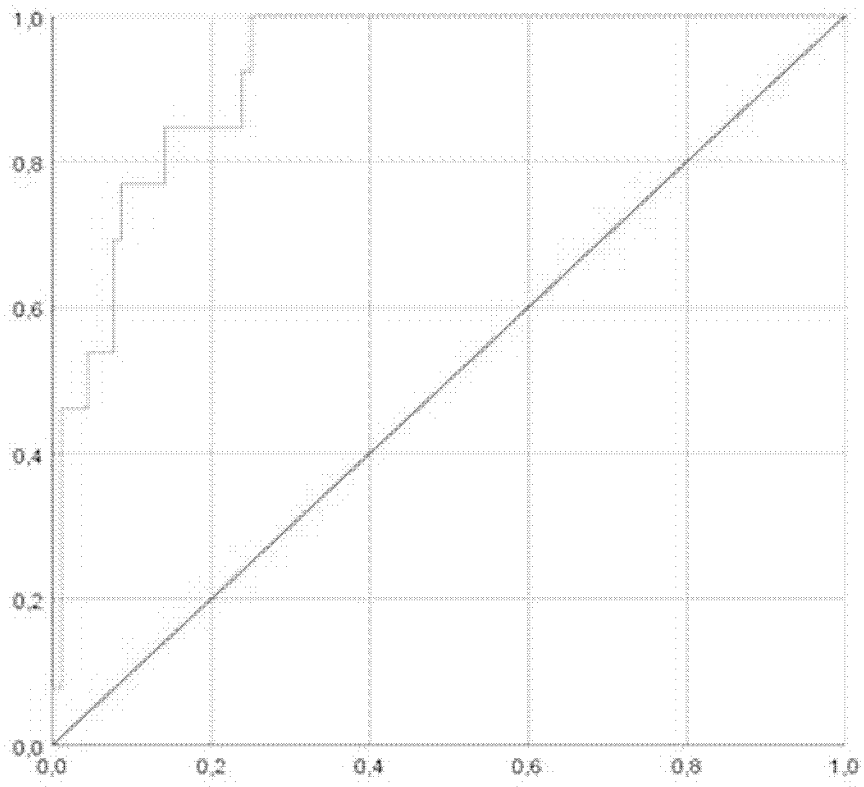


FIG. 3



- 21 N.º solicitud: 202330350
22 Fecha de presentación de la solicitud: 04.05.2023
32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. cl.: **G01N33/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GAZOULI, M. et al. "Serum protein profile of Crohn's disease treated with infliximab". Journal of Crohn's and Colitis. Noviembre 2013, Vol. 7, Nº 10, páginas: e461-e470. [en línea] [recuperado el 01/03/2024]. ISSN 1873-9946, <DOI: 10.1016/j.crohns.2013.02.021>. todo el documento.	1-15
X	SIPPONEN, T. et al. "Fecal calprotectin, lactoferrin, and endoscopic disease activity in monitoring anti-TNF-alpha therapy for Crohn's disease". Inflammatory Bowel Diseases. Octubre 2008, Vol. 14, Nº 10, páginas 1392 – 1398. [en línea] [recuperado el 01/03/2024], ISSN 1078-0998, <DOI:10.1002/ibd.20490>. todo el documento.	1-15
X	DESAI, D. et al. "Review article: biological activity markers in inflammatory bowel disease". Alimentary Pharmacology & Therapeutics. Febrero 2007, Vol. 25, Nº 3, páginas 247 – 255. [en línea] [recuperado el 01/03/2024], ISSN 0269-2813, <DOI:10.1111/j.1365-2036.2006.03184.x>. todo el documento.	1-15

Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica	O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud
--	--

El presente informe ha sido realizado ☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:
--

Fecha de realización del informe 11.03.2024	Examinador M. d. García Coca	Página 1/2
--	---------------------------------	---------------

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE/Elsevier, XPESP y Bases de Datos TXT