

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 966**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06789292 .7**  
96 Fecha de presentación: **02.08.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1945800**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.07.2008**

54 Título: **Métodos y composiciones para detectar trastornos autoinmunes**

30 Prioridad:  
**05.08.2005 US 706205 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.06.2012**

73 Titular/es:  
**GENENTECH, INC.**  
**1 DNA WAY**  
**SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:  
**ABBAS, Alexander**

74 Agente/Representante:  
**Ponti Sales, Adelaida**

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).

ES 2 383 966 T3

## DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para detectar trastornos autoinmunes

## 5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere, en general, a los campos de la determinación molecular de enfermedades autoinmunes. Más específicamente, la presente invención se refiere a métodos y composiciones basadas en firmas moleculares únicas asociadas con varios aspectos de trastornos autoinmunes.

## 10 ANTECEDENTES

[0002] Se cree ahora que un conjunto de trastornos autoinmunes están caracterizados por la producción de autoanticuerpos contra un conjunto de autoantígenos. Por ejemplo, el lupus eritematoso sistémico (SLE) es una enfermedad autoinmune en que los autoanticuerpos provocan lesiones en los órganos mediante la unión a células y tejidos huésped y mediante la formación de complejos inmunes que se depositan en tejidos vasculares y activan células inmunes. El síndrome de Sjogren es una enfermedad autoinmune caracterizada por la inflamación en las glándulas del cuerpo. Otros trastornos autoinmunes se encuentran habitualmente, incluyendo, pero sin limitación, nefropatía de IgA, psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, espondilitis anquilosante, etc.

[0003] El interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) es un interferón de Tipo I fuertemente implicado en la etiología de un conjunto de trastornos inmunes, tales como SLE. Se cree que las estrategias de tratamiento que implican la alteración de la señalización de IFN- $\alpha$  pueden ser un tratamiento efectivo para dichos trastornos. Se sabe que los niveles de IFN- $\alpha$  son elevados en el SLE, y se ha observado que el tratamiento de pacientes con IFN- $\alpha$  causa reversiblemente síntomas similares a SLE en los receptores. Otras numerosas líneas de evidencia han relacionado IFN- $\alpha$  y SLE.

[0004] Los mecanismos por los cuales el IFN- $\alpha$  ejerce sus efectos en la transcripción de genes en células diana han sido ampliamente investigados. Se ha determinado la cascada de segundos mensajeros, se han definido sitios de unión reguladores en cis para factores de transcripción activados y varios estudios han explorado qué expresión de genes se modula. El más amplio de estos estudios se ha realizado con microchips de oligonucleótidos, pero las definiciones de los perfiles de expresión génica de respuesta a interferón aún no están completas porque hasta muy recientemente los microchips no contenían un grupo muy completo de informadores para los genes del genoma humano.

[0005] Uno de los desafíos más difíciles en el tratamiento clínico de enfermedades autoinmunes es la identificación precisa y temprana de las enfermedades en un paciente. Para este fin, sería altamente ventajoso tener métodos de diagnóstico de base molecular que se puedan utilizar para identificar objetivamente la presencia y/o el grado de la enfermedad en un paciente. La presente invención aquí descrita proporciona estos métodos y otras ventajas.

[0006] WO03090694 describe grupos de marcadores para el diagnóstico o la monitorización de enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias crónicas, particularmente SLE.

## 45 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0007] La presente invención se refiere a métodos y composiciones para identificar trastornos autoinmunes basados, por lo menos, en parte, en la identificación de los genes cuya expresión está asociada con la presencia y/o el grado de lupus eritematoso sistémico (SLE), donde SLE es a su vez una enfermedad autoinmune prototípica cuyas formas de genes asociados a la enfermedad también son aplicables en otras enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, tal como se describe aquí, en una realización, se identificaron genes modulados en respuesta a la señalización por IFN- $\alpha$ . A continuación, se analizó la información generada por esta estrategia y se modificó para desarrollar una medición concisa y cuantitativa de la extensión en que las muestras de células o tejido muestran respuestas características de trastornos autoinmunes. Tal como se muestra aquí, la detección de uno o más genes específicos descritos aquí puede ser un indicador útil e informativo de la presencia y/o la extensión de trastornos autoinmunes en un paciente. Además, se pueden generar cocientes métricos o equivalentes que son indicativos de la presentación y/o gravedad de una enfermedad asociada con interferón mediante la transformación apropiada de la información de la expresión génica de biomarcadores. Se describen aquí ejemplos de transformaciones y métrica resultante generados en base a los datos de expresión génica que también se describen aquí.

[0008] En un aspecto, la presente invención proporciona un método tal como se establece en la reivindicación 1.

[0009] En un aspecto, la presente invención proporciona un método tal como se establece en la reivindicación 2.

65

**[0010]** Se describe aquí un método para monitorizar una enfermedad residual mínima en un sujeto tratado para una enfermedad autoinmune, comprendiendo dicho método determinar si el sujeto comprende una célula que expresa por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o cualquier número hasta todos los genes (o genes asociados con grupos de sondas) listados en las tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7(i), 7(ii) o 7(iii) en un nivel superior que el nivel de expresión de los genes respectivos en una muestra de referencia normal, donde la detección de dicha célula es indicativa de la presencia de una enfermedad autoinmune residual mínima.

**[0011]** Se describe aquí un método para detectar un estado patológico autoinmune en un sujeto, comprendiendo dicho método determinar si el sujeto comprende una célula que expresa por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o cualquier número hasta todos los genes (o genes asociados con grupos de sondas) listados en las tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7(i), 7(ii) o 7(iii) en un nivel superior que el nivel de expresión de los genes respectivos en una muestra de referencia normal, donde la detección de dicha célula es indicativa de la presencia de un estado patológico residual mínima.

**[0012]** En un aspecto, la presente invención proporciona un método tal como se establece en la reivindicación 3.

**[0013]** Se describe aquí un método de diagnóstico de un trastorno autoinmune en un sujeto, comprendiendo dicho método determinar si el sujeto comprende una célula que expresa por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o cualquier número hasta todos los genes (o genes asociados con grupos de sondas) listados en las tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7(i), 7(ii) o 7(iii) en un nivel superior que el nivel de expresión de los genes respectivos en una muestra de referencia normal, donde la detección de dicha célula indica que el sujeto tiene dicho trastorno autoinmune.

**[0014]** Los genes se pueden seleccionar de los genes (o genes asociados con los grupos de sondas) listados en la tabla 2, donde los genes en la tabla 2 comprenden un subgrupo de los genes indicados en la tabla 1. Los genes seleccionados pueden comprender por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o todos los genes (o genes asociados con grupos de sondas) listados en la tabla 2. Los genes también se pueden seleccionar de los genes (o genes asociados con los grupos de sondas) listados en la tabla.

**[0015]** Los métodos de la invención proporcionan información útil para determinar las etapas de intervención clínica apropiadas, si lo son y según sea apropiado. Por lo tanto, tal como se describe aquí el método pueden comprender además una etapa de intervención clínica basada en los resultados de la valoración de la expresión de uno o más de los genes (o genes asociados con grupos de sondas) listados en las tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7. Por ejemplo, la intervención apropiada puede implicar las etapas profilácticas y de tratamiento, o el ajuste o ajustes de cualquier etapa profiláctica o de tratamiento actuales basadas en la información de la expresión génica obtenida mediante un método de la invención.

**[0016]** Como sería evidente para un experto en la materia, en cualquier método de la invención, aunque la detección de la expresión incrementada de un gen indicaría positivamente una característica de una enfermedad (por ejemplo, la presencia, fase o extensión de una enfermedad), la no detección de la expresión incrementada de un gen también sería informativa al proporcionar la caracterización recíproca de la enfermedad.

**[0017]** Se describe aquí una matriz/chip de genes/grupo de genes que comprenden polinucleótidos capaces de hibridarse específicamente a por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o todos los genes (o genes asociados con grupos de sondas) listados en la tabla 1, y/o a por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o todos los genes (o genes asociados con grupos de sondas) listados en la Tabla 2, y/o a por lo menos 2 o cualquier número hasta todos los genes (o genes asociados con grupos de sondas) listados en la tabla 3, 4, 5, 6 ó 7, tal como se establece en la reivindicación 5.

**[0018]** Se describe aquí un kit que comprende una composición, e instrucciones para utilizar la composición para detectar un trastorno autoinmune mediante la determinación de si la expresión de por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17; 18, 19, 20 o todos los genes (o genes asociados con grupos de sondas) listados en la Tabla 1, y/o por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o todos los genes (o genes asociados con grupos de sondas) listados en la Tabla 2, y/o por lo menos 2 o cualquier número hasta todos los genes (o genes asociados con grupos de sondas) listados en las Tablas 3, 4, 5, 6 ó 7 están en un nivel superior al nivel de expresión de los genes respectivos en una muestra de referencia normal. La composición puede ser una matriz/chip de genes/grupos de genes capaces de hibridarse específicamente a por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o todos los genes (o genes asociados con grupos de sondas) listados en la tabla 1, y/o a por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o todos los genes (o genes asociados con grupos de sondas) listados en la Tabla 2, y/o a por lo menos 2 o cualquier número hasta todos los genes (o genes asociados con grupos de sondas) listados en la tabla 3, 4, 5, 6 ó 7. La composición puede comprender moléculas de ácido nucleico que codifican por lo menos una parte de un polipéptido codificado por un gen (o gen asociado con un grupo de sondas) listados en la Tabla 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7. La composición puede comprender un agente de unión que se une específicamente a por lo menos una parte de un polipéptido codificado por un gen (o gen asociado con un grupo de sondas) listado en las Tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7.

**[0019]** Los métodos y composiciones aquí descritos pueden comprender uno o más de los genes listados en las Tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7. Si se utiliza o se incluye más de un gen, el más de un gen puede ser cualquier combinación de cualquier número de los genes (o genes asociados con grupos de sondas) tal como se lista (sin un orden concreto) en las Tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7. Por ejemplo, una combinación de genes comprende sólo dos genes que corresponden con los grupos de sondas listados en la Tabla 7(i). Se describe aquí una combinación de genes que comprende los genes asociados con los grupos de sondas de la Tabla 7(i), y uno o más de otros genes (o genes asociados con grupos de sondas) listados en la Tabla 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. Por ejemplo, una de dichas combinaciones puede comprender genes asociados con los grupos de sondas listados en la Tabla 7(ii), y otra de dichas combinaciones puede comprender genes asociados con los grupos de sondas listados en la Tabla 7(iii). Se describe aquí una combinación de genes que comprende uno o más de los genes (o genes asociados con grupos de sondas) listados en las Tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7, combinado además con uno o más de otros genes (o genes asociados con grupos de sondas) que no están listados en las Tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 (por ejemplo, un gen conocido por estar asociado con una enfermedad autoinmune, pero no asociado con la inducción por interferones específicamente).

**[0020]** Se describe aquí un método de identificación de un valor métrico correlacionado con la presencia de y/o la extensión de un trastorno autoinmune en un sujeto o muestra, comprendiendo dicho método:

(a) estimar un grupo de grupos de sondas que están colectivamente asociadas con un patrón, en la que la expresión de genes representados por los grupos de sondas está asociada con una característica de la enfermedad;

(b) generar un factor de ponderación que pondera los grupos de sondas según una escala que refleja el grado de apareamiento de cada grupo de sondas individual de tendencia al grupo de grupos de sondas, y calcular el coeficiente de correlación de cada perfil de grupos de sondas con el perfil promedio calculado;

(c) determinar un factor de escalado, donde el factor de escalado es el valor requerido para escalar los grupos de sondas individuales a 1;

(d) multiplicar el factor de escalado por el factor de ponderación para generar un factor compuesto;

(e) multiplicar firmas de la muestra de sangre normal con el factor compuesto, y promediar los valores resultantes a lo largo de los grupos de sondas y las muestras para generar un valor promedio e invertir el valor promedio para proporcionar un factor de escalado global;

(f) multiplicar cada factor de ponderación por el factor de escalado global para obtener un vector de valores escalares y multiplicar los valores escalares por una firma de expresión de una muestra de interés y promediar los valores resultantes para proporcionar un único valor métrico que es indicativa del grado de expresión génica asociada con los interferones Tipo I en la muestra.

**[0021]** En el método del párrafo anterior, en la etapa (a), el grupo de grupos de sondas puede comprender grupos de sondas que incluyen, o agrupan, la pareja central de grupos de sondas más estrechamente correlacionadas en un subgrupo asociado con una característica de la enfermedad.

**[0022]** En el método de los párrafos anteriores, en la etapa (b), el factor se genera transformando los datos de expresión del grupo de grupos de sondas en valoraciones  $z$  que comprende el escalado promedio a 1, la transformación logarítmica en base 2, a continuación el escalado a una desviación estándar del promedio de 1.

**[0023]** En el método de los párrafos anteriores, en la etapa (e), el factor de escalado global es útil para transformar la salida del promedio de grupos de sondas de una muestra de interés en un valor métrico, en el que el valor métrico es 1 si la muestra es de un sujeto sano normal.

**[0024]** El grupo de grupos de sondas puede comprender por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o todos los listados en la Tabla 1, y/o por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o todos los listados en la Tabla 2, y/o por lo menos 2 o cualquier número hasta todos los listados en las Tablas 3, 4, 5, 6 ó 7. El grupo de grupo de sondas puede comprender todos los listados en las Tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6, ó 7. El grupo de grupos de sondas puede comprender por lo menos 2 (o cualquier número entero hasta todos) de los listados en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 5 o Tabla 6. El grupo de grupo de sondas puede comprender todos los listados en la Tabla 7(i), 7(ii) o 7(iii).

**[0025]** Se describe aquí un método que comprende la comparación de un primer valor métrico obtenido mediante un método descrito aquí para una muestra obtenida de un sujeto de interés con un valor métrico de referencia obtenido de una muestra de referencia (por ejemplo, normal, sana, sin enfermedad), en el que un primer valor métrico que es superior a un valor métrico de referencia indica la presencia de un trastorno autoinmune en el sujeto de interés.

**[0026]** Se describe aquí un método de predicción de la sensibilidad de un sujeto a la terapia de una enfermedad autoinmune, comprendiendo dicho método la comparación de un primer valor métrico obtenido mediante un método descrito aquí para una muestra obtenida del sujeto con un valor métrico de referencia obtenido de una muestra de referencia (por ejemplo, normal, sana, sin enfermedad), en el que un primer valor métrico que es superior a un valor métrico de referencia indica que el sujeto sería sensible a la terapia de una enfermedad autoinmune.

**[0027]** Se describe aquí un método para monitorizar una enfermedad residual mínima en un sujeto tratado para una enfermedad autoinmune, comprendiendo dicho método la comparación de un primer valor métrico obtenido mediante un método descrito aquí para una muestra obtenida del sujeto con un valor métrico de referencia obtenido de una muestra de referencia (por ejemplo, normal, sana, sin enfermedad, no tratada), en el que un primer valor métrico que es superior a un valor métrico de referencia es indicativo de la presencia de una enfermedad autoinmune residual mínima.

**[0028]** Se describe aquí un método para detectar un estado patológico autoinmune, comprendiendo dicho método la comparación de un primer valor métrico obtenido mediante un método descrito aquí para una muestra de un sujeto sospechoso de tener el estado patológico autoinmune con un valor métrico de referencia obtenido de una muestra de referencia (por ejemplo, normal, sana, sin enfermedad), en el que un primer valor métrico que es superior a un valor métrico de referencia es indicativo de la presencia del estado patológico autoinmune en el sujeto.

**[0029]** Se describe aquí un método para valorar la predisposición de un sujeto a desarrollar un trastorno autoinmune, comprendiendo dicho método la comparación de un primer valor métrico obtenido mediante un método descrito aquí para una muestra obtenida del sujeto con un valor métrico de referencia obtenido de una muestra de referencia (por ejemplo, normal, sana, sin enfermedad), en el que un primer valor métrico que es superior a un valor métrico de referencia es indicativo de una predisposición para el sujeto de desarrollar el trastorno autoinmune.

**[0030]** Se describe aquí un método para el diagnóstico de un trastorno autoinmune en un sujeto, comprendiendo dicho método la comparación de un primer valor métrico obtenido mediante un método descrito aquí para una muestra obtenida del sujeto con un valor métrico de referencia obtenido de una muestra de referencia (por ejemplo, normal, sana, sin enfermedad), en el que un primer valor métrico que es superior a un valor métrico de referencia indica que el sujeto tiene dicho trastorno autoinmune.

**[0031]** Se describe aquí un método para diferenciar entre estados patológicos activos e inactivos (por ejemplo, SLE activo e inactivo) en un sujeto, comprendiendo dicho método la comparación de un primer valor métrico obtenido mediante un método descrito aquí para una muestra obtenida del sujeto con un valor métrico de referencia obtenido de una muestra de referencia (por ejemplo, normal, sana, sin enfermedad), en el que un primer valor métrico que es superior a un valor métrico de referencia indica que el sujeto tiene el trastorno autoinmune en su estado activo.

**[0032]** Un valor métrico de referencia se puede obtener utilizando un métodos descrito aquí para una muestra de una muestra de control (por ejemplo, obtenida de un tejido, célula y/o sujeto sano y/o no enfermo y/o no tratado).

**[0033]** Las etapas en los métodos para examinar la expresión de uno o más biomarcadores se pueden realizar en un conjunto de formatos de ensayo, incluyendo ensayos que detectan la expresión de ARNm, ensayos enzimáticos que detectan la presencia de actividad enzimática, y ensayos inmunohistoquímicos. Opcionalmente, la muestra de tejido o células comprende tejidos o células enfermas.

**[0034]** Se describen aquí métodos de tratamiento de un trastorno en un mamífero, tal como un trastorno relacionado con el sistema inmune, que comprende las etapas de obtener tejido o una muestra celular del mamífero, examinar el tejido o células para la expresión (por ejemplo, cantidad de expresión) de uno o más biomarcadores y tras determinar que dicho muestra de tejido o célula expresa dicho uno o más biomarcadores (por ejemplo, donde los biomarcadores se expresan en cantidades superiores a una muestra de referencia (control)), administrar una cantidad eficaz de un agente terapéutico a dicho mamífero. Las etapas en los métodos para examinar la expresión de uno o más biomarcadores se puede realizar en un conjunto de formatos de ensayo, incluyendo ensayos que detectan la expresión de ARNm, ensayos enzimáticos que detectan la presencia de actividad enzimática, y ensayos inmunohistoquímicos. Opcionalmente, los métodos comprenden tratar un trastorno autoinmune en un mamífero. Opcionalmente, los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de un agente terapéutico dirigido (por ejemplo, un anticuerpo que se une y/o bloquea la actividad de interferones tipo 1 y/o su correspondiente receptor o receptores, y un segundo agente terapéutico (por ejemplo, esteroides) a dicho mamífero.

**[0035]** Los biomarcadores se pueden seleccionar de los listados en las Tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**[0036]**

5 La figura 1 es una representación gráfica de análisis de datos IRGM para muestras individuales clasificadas de células de sangre completa (WBC) de paciente normal y con SLE.

La figura 2 es una representación gráfica de análisis de datos IRGM para muestras individuales clasificadas de células de sangre completa (WBC) de paciente normal y con nefropatía de IgA.

10 La figura 3 es una representación gráfica de análisis de datos IRGM para muestras individuales clasificadas de biopsia de piel normal, piel con lesión psoriática y piel sin lesión psoriática.

15 La figura 4 es una representación gráfica de la correlación de los valores de SLEDAI con IRGM.

La figura 5 es una representación de la densidad que muestra una región de concentración elevada de genes inducidos por interferón en un grupo bidimensional de datos de la expresión génica de todo el genoma de muestras de control y de sangre completa con SLE.

20 La figura 6 representa promedios distintos de la métrica de genes en respuesta a interferones tipo I (IRGM) para pacientes con SLE y pacientes de control sanos.

La figura 7 representa distribuciones distintas de la métrica de genes en respuesta a interferones tipo I (IRGM) para pacientes con SLE y pacientes de control sanos.

25 **MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION**

## Técnicas generales

30 **[0037]** La práctica de la presente invención utilizará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología molecular, bioquímica e inmunología, que se encuentran en el conocimiento de la técnica. Dichas técnicas se explican de manera completa en la literatura, tal como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, y actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., eds., 1994).

40 **[0038]** Los cebadores, oligonucleótidos y polinucleótidos utilizados en la presente invención se pueden generar utilizando técnicas estándar conocidas en el sector.

45 **[0039]** A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que se entiende normalmente por un experto en la materia al que pertenece la invención. Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994), y March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed., John Wiley & Sons (New York, N.Y. 1992), proporcionan a un experto en la materia una guía general para muchos términos utilizados en la presente solicitud.

## Definiciones

50 **[0040]** El término "matriz" o "chip" o "microchip" o "micromatriz", tal como se utilizan aquí, se refiere a una disposición ordenada de elementos de chips hibridables, preferiblemente sondas de polinucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos) en un sustrato. El sustrato puede ser un sustrato sólido, tal como un portaobjetos de vidrio, o un sustrato semisólido, tal como membrana de nitrocelulosa. Las secuencias de nucleótidos pueden ser ADN, ARN o cualquier permutación de las mismas.

60 **[0041]** Una "secuencia diana", "ácido nucleico diana" o "proteína diana", tal como se utiliza aquí, es una secuencia de polinucleótidos de interés, en que se sabe o se sospecha que reside una mutación, la detección de la cual se desea. En general, una "plantilla", tal como se utiliza aquí, es un polinucleótido que contiene la secuencia de nucleótidos diana. En algunos casos, los términos "secuencia diana", "ADN plantilla", "polinucleótido plantilla", "ácido nucleico diana", "polinucleótido diana" y variaciones de los mismos, se utilizan indistintamente.

65 **[0042]** "Amplificación," tal como se utiliza aquí, se refiere en general al proceso de producción de múltiples copias de una secuencia deseada. "Múltiples copias" significa por lo menos 2 copias. Una "copia" no significa necesariamente una complementariedad o identidad perfecta de secuencia con la secuencia plantilla. Por

ejemplo, las copias pueden incluir análogos de nucleótidos, tales como desoxiinosina, alteraciones intencionadas de la secuencia (tales como alteraciones de la secuencia introducidas a través de un cebador que comprende una secuencia que es hibridable, pero no complementaria, con la plantilla), y/o errores en la secuencia que ocurren durante la amplificación.

**[0043]** La expresión/cantidad de un gen o biomarcador en una primera muestra es a un nivel "superior a" el nivel en una segunda muestra si el nivel/cantidad de expresión del gen o biomarcador en la primera muestra es por lo menos aproximadamente 1,5, 1,75, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ó 10 veces el nivel/cantidad de expresión del gen o biomarcador en la segunda muestra. Los niveles/cantidad de expresión se puede determinar en base a cualquier criterio adecuado conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, ARNm, ADNc, proteínas, fragmentos de proteínas y/o copia de genes. Los niveles/cantidades de expresión se pueden determinar cualitativamente y/o cuantitativamente.

**[0044]** "Polinucleótido" o "ácido nucleico", tal como se utilizan indistintamente aquí, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se puede incorporar en un polímero mediante ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación en la estructura de nucleótidos se puede realizar antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir mediante componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante la conjugación con un componente marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "bloqueadores", sustitución de uno o más nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleótidos, tales como, por ejemplo, aquellas con uniones no cargadas (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con uniones cargadas (por ejemplo, fosforotioatos, fosforditioatos, etc.), aquellas que contienen grupos colgando, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellas con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoralen, etc.), aquellas que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellas que contienen alquilantes, aquellas con uniones modificadas (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anómicos, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido o polinucleótidos. Además, se puede sustituir cualquier grupo hidroxilo presente normalmente en los azúcares, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protectores estándar o activados para preparar uniones adicionales a nucleótidos adicionales, o se pueden conjugar a soportes sólidos. El OH 5' y 3' terminal se puede fosforilar o sustituir con aminas o restos de grupos de bloqueo orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. También se pueden derivar otros hidroxilos a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que son conocidas generalmente en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-2'-O-allyl-, 2'-fluoro o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa-anómicos, azúcares epiméricos, tales como arabinosa, xilasas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acídicos y análogos de nucleósidos básicos, tales como metil ribósido. Se pueden sustituir uno o más enlaces fosfodiéster por grupos de unión alternativos. Estos grupos de unión alternativos incluyen, pero sin limitación, realizaciones en las que el fosfato se sustituye por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR<sup>2</sup>" ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH<sub>2</sub> ("formacetal"), en que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que opcionalmente contienen una unión éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todas las uniones en un polinucleótido necesitan ser idénticas. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos referidos aquí, incluyendo ARN y ADN.

**[0045]** "Oligonucleótido," tal como se utiliza aquí, se refiere en general a polinucleótidos cortos, generalmente de una cadena, generalmente sintéticos, que tienen, en general pero no necesariamente, menos de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no se excluyen mutuamente. La descripción anterior para polinucleótidos es igualmente y totalmente aplicable a oligonucleótidos.

**[0046]** Un "cebador" es en general un polinucleótido de cadena corta única, generalmente con un grupo 3'-OH libre, que se une a una diana potencialmente presente en una muestra de interés mediante la hibridación con una secuencia diana y, a continuación, la inducción de la polimerización de un polinucleótido complementario a la diana.

**[0047]** La frase "amplificación de genes" se refiere a un proceso por el cual se forman múltiples copias de un gen o fragmento de gen en una célula o línea celular particular. La región duplicada (un tramo de ADN amplificado) se refiere a menudo como "amplicón". Normalmente, la cantidad de ARN mensajero (ARNm) producido, es decir, el nivel de expresión génica, también se incrementa en la proporción del número de copias realizadas del gen particular expresado.

**[0048]** El término "mutación", tal como se utiliza aquí, significa una diferencia en la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos de una proteína o ácido nucleico particular (gen, ARN) en relación a la proteína o ácido nucleico salvaje, respectivamente. Una proteína o ácido nucleico mutados se pueden expresar a partir de o se pueden

hallar en un alelo (heterocigótico) o ambos alelos (homocigótico) de un gen, y pueden ser una línea somática o germinal.

[0049] "Inhibir" es disminuir o reducir una actividad, función y/o una cantidad en comparación con una referencia.

[0050] El término "3'" se refiere, en general, a una región o posición en un polinucleótido u oligonucleótido 3' (en dirección 3') de otra región o posición en el mismo polinucleótido u oligonucleótido. El término "5'" se refiere, en general, a una región o posición en un polinucleótido u oligonucleótido 5' (en dirección 5') de otra región o posición en el mismo polinucleótido u oligonucleótido

[0051] "Detección" incluye cualquier medio de detección, incluyendo detección directa o indirecta.

[0052] El término "diagnóstico" se utiliza aquí para referirse a la identificación de un estado molecular patológico, enfermedad o condición, tal como la identificación de un trastorno autoinmune. El término "pronóstico" se utiliza aquí para referirse a la predicción de la probabilidad de una enfermedad atribuible a un trastorno autoinmune incluyendo, por ejemplo, recurrencia, empeoramiento y resistencia a los fármacos, de una enfermedad autoinmune. El término "predicción" se utiliza aquí para referirse a la probabilidad de que un paciente responderá favorablemente o desfavorablemente a un fármaco o grupo de fármacos. En una realización, la predicción se refiere a la extensión de estas respuestas. En una realización, la predicción se refiere a si ocurre y/o la probabilidad de que un paciente sobrevivirá o mejorará tras el tratamiento, por ejemplo, el tratamiento con un agente terapéutico particular, y durante un cierto periodo de tiempo sin recurrencia de la enfermedad. Los métodos predictivos de la invención se pueden utilizar clínicamente para tomar decisiones del tratamiento mediante la elección de las modalidades de tratamiento más apropiadas para cualquier paciente en concreto. Los métodos predictivos de la presente invención son herramientas valiosas en la predicción de si un paciente probablemente responderá favorablemente a una pauta de tratamiento, tal como una pauta terapéutica determinada, incluyendo, por ejemplo, la administración de un agente terapéutico determinado o combinación, intervención terapéutica, tratamiento con esteroides, etc. o si es probable la supervivencia a largo plazo del paciente después de una pauta terapéutica.

[0053] El término supervivencia "a largo plazo" se utiliza aquí para referirse a la supervivencia durante por lo menos 1 año, 5 años, 8 años o 10 años después del tratamiento terapéutico.

[0054] El término "resistencia incrementada" a un agente terapéutico particular u opción de tratamiento, cuando se utiliza según la presente invención, significa una respuesta disminuida a una dosis estándar del fármaco o un protocolo de tratamiento estándar.

[0055] El término "sensibilidad disminuida" a un agente terapéutico particular u opción de tratamiento, cuando se utiliza según la presente invención, significa una respuesta disminuida a una dosis estándar del agente o un protocolo de tratamiento estándar, donde la respuesta disminuida se puede compensar (por lo menos parcialmente) mediante el incremento de la dosis del agente, o la intensidad del tratamiento.

[0056] La "respuesta de paciente" se puede valorar utilizando cualquier punto final que indica un beneficio al paciente, incluyendo, sin limitación, (1) la inhibición, en cierto grado, de progresión de la enfermedad, incluyendo la ralentización y detención completa; (2) reducción en el número de episodios y/o síntomas de la enfermedad; (3) reducción en el tamaño de la lesión; (4) inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la infiltración celular de la enfermedad en órganos y/o tejidos periféricos adyacentes; (5) inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la extensión de la enfermedad; (6) disminución de respuesta autoinmune, que puede, pero no necesariamente, dar lugar a la regresión o ablación de la lesión de la enfermedad; (7) alivio, en cierto grado, de uno o más síntomas asociados con el trastorno; (8) incremento en la longitud de la presentación sin enfermedad después del tratamiento; y/o (9) mortalidad disminuida en un punto determinado de tiempo después del tratamiento.

[0057] El término "inhibidor de interferón", tal como se utiliza aquí, se refiere a una molécula que tiene la capacidad de inhibir una función biológica de interferón tipo 1 de tipo salvaje o mutado. Por consiguiente, el término "inhibidor" se define en el contexto de la función biológica del interferón Tipo 1. En una realización, un inhibidor de interferón referido en la presente invención inhibe específicamente la señalización celular a través del mecanismo de interferón tipo 1/receptor de interferón. Por ejemplo, un inhibidor de interferón puede interactuar con (por ejemplo, unirse a) receptor de interferón alfa, o con un interferón tipo 1 que se une normalmente a un receptor de interferón. En una realización, un inhibidor de interferón se une al dominio extracelular del receptor de interferón alfa. En una realización, el inhibidor de interferón se une al dominio intracelular del receptor de interferón alfa. En una realización, un inhibidor de interferón se une a interferón tipo 1. En una realización, el interferón tipo 1 es un interferón del subtipo alfa. En una realización, el interferón tipo 1 no es un interferón beta. En una realización, el interferón Tipo 1 no es un interferón omega. En una realización, la actividad biológica de interferón inhibida por un inhibidor de interferón está asociada con un trastorno inmune, tal como un trastorno autoinmune. Un inhibidor de interferón puede estar en cualquier forma, siempre que sea capaz de inhibir la actividad interferón/receptor; los inhibidores incluyen anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos

monoclonales tal como se define aquí a continuación), moléculas orgánicas/inorgánicas pequeñas, oligonucleótidos antisentido, aptámeros, péptidos/polipéptidos inhibidores, ARN inhibidores (por ejemplo, ARN de interferencia pequeños), combinaciones de los mismos, etc.

**[0058]** "Anticuerpos" (Abs) e "inmunoglobulinas" (Igs) se refieren a glicoproteínas que tienen características estructurales similares. Aunque los anticuerpos muestran especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas parecidas a anticuerpos que carecen generalmente de especificidad a antígeno. Los polipéptidos del último tipo se producen, por ejemplo, a niveles bajos por el sistema linfático y a niveles incrementados por mielomas.

**[0059]** Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se utilizan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos monovalentes, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, siempre que muestren la actividad biológica deseada), y también pueden incluir ciertos fragmentos de anticuerpos (tal como se describe en detalle aquí). Un anticuerpo puede ser quimérico, humano, humanizado y/o madurado para afinidad.

**[0060]** "Fragmentos de anticuerpos" comprenden sólo una parte de un anticuerpo intacto, donde la parte retiene preferiblemente, por lo menos preferiblemente la mayoría o todas, las funciones asociadas normalmente con la parte cuando está presente en un anticuerpo intacto. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión antígeno del anticuerpo intacto y, de este modo, retiene la capacidad de unirse a antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, aquel que comprende la región Fc, retiene por lo menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como la unión a FcRn, la modulación de la vida media del anticuerpo, la función ADCC y la unión a complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una vida media in vivo sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión a antígeno unido a una secuencia de Fc capaz de conferir estabilidad in vivo al fragmento.

**[0061]** El término "anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza aquí, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden presentarse en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único antígeno. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que habitualmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige hacia un único determinante en un antígeno.

**[0062]** Entre los anticuerpos monoclonales de la presente invención se incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de cadena o cadenas es idéntico con u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)).

**[0063]** Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la estructura ("framework") (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo dador. Estas modificaciones se pueden realizar para refinar adicionalmente la acción del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente por lo menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986), Reichmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas en los mismos: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurlle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

**[0064]** Un "anticuerpo humano" es aquel que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano y/o se ha producido utilizando cualquiera de las técnicas para fabricar anticuerpos humanos tal como se describe aquí. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno de un animal no humano.

**[0065]** Un anticuerpo "madurado para afinidad" es aquel con una o más alteraciones en una o más de CDR del mismo que dan lugar a una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esta alteración o alteraciones. En una realización, un anticuerpo madurado para afinidad tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno diana. Los anticuerpos madurados para afinidad se producen mediante métodos conocidos en la técnica. Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describe la maduración para afinidad por mezcla aleatoria de los dominios de VH y VL. La mutagénesis aleatoria de los residuos de HVR y/o armazón se describe por: Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

**[0066]** El término "región Fc" se utiliza para definir la región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que puede estar generada por la digestión por papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define normalmente como un tramo desde un residuo de aminoácido en la posición aproximada Cys226, o desde aproximadamente la posición Pro230, hasta el extremo carboxilo de la región Fc. La región Fc de una inmunoglobulina comprende en general dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3, y opcionalmente comprende un dominio CH4. Por "cadena de región Fc" se entiende aquí una de las dos cadenas de polipéptido de una región Fc.

**[0067]** El término "agente citotóxico", tal como se utiliza aquí, se refiere a una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o causa la destrucción celular. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo,  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ , e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos y toxinas, tales como toxinas que son moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas.

**[0068]** Un anticuerpo "bloqueador" o un anticuerpo "antagonista" es aquel que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Dicho bloqueo puede tener lugar mediante cualquier medio, por ejemplo, interfiriendo con la interacción proteína-proteína, tal como la unión de ligando a un receptor. En una realización, los anticuerpos bloqueadores o los anticuerpos antagonistas inhiben sustancialmente o completamente la actividad biológica del antígeno.

**[0069]** Una "enfermedad autoinmune" en la presente invención es una enfermedad o trastorno no maligno que surge de y está dirigido contra los propios tejidos del individuo. Las enfermedades autoinmunes de la presente invención excluyen específicamente las enfermedades o afecciones malignas o cancerosas, especialmente excluyen el linfoma de células B, la leucemia linfoblástica aguda (ALL), la leucemia linfocítica crónica (CLL), la leucemia de células pilosas y la leucemia mieloblástica crónica. Ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunes incluyen, pero sin limitación, respuestas inflamatorias, tales como enfermedades inflamatorias de la piel que incluyen psoriasis y dermatitis (por ejemplo, dermatitis atópica); escleroderma sistémico y esclerosis; respuestas asociadas con la enfermedad inflamatoria intestinal (tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); síndrome de distrés respiratorio (incluyendo síndrome de distrés respiratorio adulto; ARDS); dermatitis, meningitis; encefalitis; uveitis; colitis; glomerulonefritis; afecciones alérgicas, tales como eczema y asma y otras afecciones que implican la infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas; aterosclerosis; deficiencia de la adhesión leucocitaria; artritis reumatoide; lupus eritematoso sistémico (SLE) (incluyendo, pero sin limitación, lupus nefritis, lupus cutáneo); diabetes mellitus (por ejemplo, diabetes mellitus Tipo I o diabetes mellitus insulino dependiente); esclerosis múltiple; síndrome de Reynaud; tiroiditis autoinmune; tiroiditis de Hashimoto; encefalomiелitis alérgica; síndrome de Sjogren; diabetes de aparición juvenil; y respuestas inmunes asociadas con hipersensibilidad aguda y retrasada mediada por citoquinas y linfocitos T hallados normalmente en tuberculosis, sarcoidosis, polimiositis, granulomatosis y vasculitis; anemia perniciosa (enfermedad de Addison); enfermedades que implican diapedesis leucocitaria; trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC); síndrome de lesión multiorgánica; anemia hemolítica (incluyendo, pero sin limitación, crioglobulinemia o anemia positiva de Coombs) ; miastenia gravis; enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo; enfermedad de la membrana basal anti-glomerular; síndrome antifosfolípidos; neuritis alérgica; enfermedad de Graves; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; penfigoide bulloso; pénfigo; poliendocrinopatías autoinmunes; enfermedad de Reiter; síndrome del hombre rígido; enfermedad de Behcet; arteritis de células gigantes; nefritis compleja inmune; nefropatía de IgA; polineuropatías de IgM; púrpura trombocitopénica inmune (ITP) o trombocitopenia autoinmune, etc.

**[0070]** El término "muestra", tal como se utiliza aquí, se refiere a una composición que se obtiene o deriva de un sujeto de interés que contiene una entidad celular y/u otra entidad molecular que se va a caracterizar y/o

identificar, por ejemplo, en base a las características físicas, bioquímicas, químicas y/o fisiológicas. Por ejemplo, la frase "muestra de la enfermedad" y variaciones de la misma se refiere a cualquier muestra obtenida de un sujeto de interés que se esperaría o que se sabe que contiene la entidad celular y/o molecular que va a caracterizarse.

**[0071]** Tal como se utiliza aquí, "tratamiento" se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo o célula en tratamiento, y se puede realizar para la profilaxis o durante la evolución de la patología clínica. Los efectos deseables de tratamiento incluyen evitar la aparición o recurrencia de la enfermedad, alivio de síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta, disminución de la velocidad de progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado patológico, y remisión o pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, los métodos y composiciones de la invención son útiles en el intento de retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno.

**[0072]** Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosis y periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente terapéutico puede variar según factores, tales como el estado patológico, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo de producir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella en que cualquier efecto tóxico o perjudicial del agente terapéutico es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesario, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Habitualmente, pero no necesariamente, dado que se utiliza una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa anterior de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz.

**[0073]** Tal como se utiliza aquí, los términos "interferón tipo I" e "interferón tipo I humano" se definen como todas las especies de interferón humano y sintético nativo que se encuentra en las clases de interferón- $\alpha$ , interferón  $\beta$  humanos y sintéticos y que se unen a un receptor celular común. El interferón - $\alpha$  humano natural comprende 23 o más proteínas estrechamente relacionadas codificadas por genes diferentes con un grado elevado de homología estructural (Weissmann y Weber, Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol., 33: 251 (1986); J. Interferon Res., 13: 443-444 (1993)). El locus del IFN- $\alpha$  comprende dos subfamilias. La primera subfamilia consiste en por lo menos 14 genes no alélicos funcionales, incluyendo genes que codifican IFN- $\alpha$ A (IFN- $\alpha$ 2), IFN- $\alpha$ B (IFN- $\alpha$ 8), IFN- $\alpha$ C (IFN- $\alpha$ 10), IFN- $\alpha$ D (IFN- $\alpha$ 1), IFN- $\alpha$ E (IFN- $\alpha$ 22), IFN- $\alpha$ F (IFN- $\alpha$ 21), IFN- $\alpha$ G (IFN- $\alpha$ 5), IFN- $\alpha$ 16, IFN- $\alpha$ 17, IFN- $\alpha$ 4, IFN- $\alpha$ 6, IFN- $\alpha$ 7, e IFN- $\alpha$ H (IFN- $\alpha$ 14), y pseudogenes que tienen por lo menos un 80% de homología. La segunda subfamilia,  $\alpha$ <sub>n</sub> o  $\omega$ , contiene por lo menos 5 pseudogenes y 1 gen funcional (indicado aquí como "IFN- $\alpha$ <sub>n</sub>1" o "IFN- $\omega$ ") que muestra el 70% de homología con los genes de IFN- $\alpha$  (Weissmann y Weber (1986)). El IFN- $\beta$  humano se cree en general que está codificado por una única copia génica.

**[0074]** Tal como se utiliza aquí, los términos "receptor del primer interferón- $\alpha$  humano (hIFN- $\alpha$ )", "IFN- $\alpha$ R", "hIFNAR1", "IFNAR1", y "cadena Uze" se definen como la proteína receptora de 557 aminoácidos clonada por Uze et al., Cell, 60: 225-234 (1990), incluyendo un dominio extracelular de 409 residuos, un dominio transmembrana de 21 residuos, y un dominio intracelular de 100 residuos, tal como se muestra en la figura 5 en la página 229 de Uze et al. En una realización, los términos anteriores incluyen fragmentos de IFNAR1 que contienen el dominio extracelular (ECD) (o fragmentos del ECD) de IFNAR1.

**[0075]** Tal como se utiliza aquí, los términos "receptor del segundo interferón humano (hIFN- $\beta$ )", "IFN- $\beta$ R", "hIFNAR2", "IFNAR2", y "cadena Novick" se definen como la proteína receptora de 515 aminoácidos clonada por Domanski et al., J. Biol. Chem., 37: 21606-21611 (1995), incluyendo un dominio extracelular de 217 residuos, un dominio transmembrana de 21 residuos, y un dominio intracelular de 250 residuos, tal como se muestra en la figura 1 de la página 21608 de Domanski et al. En una realización, los términos anteriores incluyen fragmentos de IFNAR2 que contienen el dominio extracelular (ECD) (o fragmentos del ECD) de IFNAR2, y formas solubles de IFNAR2, tales como ECD de IFNAR2 fusionado a por lo menos una parte de una secuencia de inmunoglobulina.

**[0076]** El término "genes constitutivos" se refiere a un grupo de genes que codifican proteínas cuyas actividades son esenciales para el mantenimiento de la función celular. Estos genes se expresan habitualmente de manera similar en todos los tipos de células. Entre los genes constitutivos se incluyen, sin limitación, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), Cypl, albúmina, actinas, por ejemplo  $\beta$ -actina, tubulinas, ciclofilina, hipoxantina fosforibosiltransferasa (HRPT), L32. 28S, y 18S.

**[0077]** El término "biomarcador", tal como se utiliza aquí, se refiere generalmente a una molécula que incluye un gen, proteína, estructura de hidrato de carbono o glicolípido, cuya expresión en o sobre un tejido o célula de mamífero puede detectarse mediante métodos convencionales (o métodos descritos en este documento) y es predictivo, diagnóstico y/o pronóstico de la sensibilidad de células o tejidos de un mamífero a pautas de tratamiento basados en la inhibición de interferones, por ejemplo, interferones Tipo 1. Opcionalmente, la expresión de dicho biomarcador se determina que es superior a la observada para una muestra de tejido o de células de control/referencia. Opcionalmente, por ejemplo, la expresión de dicho biomarcador se determinará en

un ensayo de PCR o FACS que es al menos 50 veces, o preferentemente al menos 100 veces, superior en la muestra de tejido o de células de prueba que la observada para una muestra de tejido o de células de control. Opcionalmente, la expresión de dicho biomarcador se determinará en un ensayo de IHC para puntuar al menos 2 o más para la intensidad de tinción. Opcionalmente, la expresión de dicho biomarcador se determinará utilizando un ensayo bsado en chips de genes.

**[0078]** Un "IRG" o "gen de respuesta a interferón", tal como se utiliza aquí, se refiere a uno o más de los genes y los correspondientes productos génicos, listados en las tablas 1 y 2. Tal como se muestra aquí, los niveles de expresión/cantidades aberrantes de uno o más de estos genes se correlacionan con una variedad de trastornos autoinmunes. Tal como es evidente para un experto en la materia, dependiendo del contexto, el término IRG puede referirse a ácidos nucleicos (por ejemplo, genes) o polipéptidos (por ejemplo, proteínas) que tiene la designación o identificador único listado en las Tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6, y/o 7.

**[0079]** Por "muestra de tejido o de células" se indica una colección de células similares obtenidas de un tejido de un sujeto o paciente. La fuente de la muestra de tejido o de células puede ser tejido sólido como de un órgano fresco, congelado y/o conservado o muestra de tejido o biopsia o aspirado; sangre o cualquier constituyente de la sangre; fluidos corporales tales como líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido peritoneal o líquido intersticial; células de cualquier tiempo de la gestación o desarrollo del sujeto. La muestra de tejido también puede ser células o líneas de células primarias o cultivadas. Opcionalmente, la muestra de tejido o de células se obtiene de un tumor primario o metastásico. La muestra de tejido puede contener compuestos que no están mezclados de forma natural con el tejido en la naturaleza, tales como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares.

**[0080]** Con los fines en este documento, una "sección" de una muestra de tejido indica una parte individual o trozo de una muestra de tejido, por ejemplo, una fina porción de tejido o células cortada de una muestra de tejido. Se entiende que pueden tomarse múltiples secciones de muestras de tejido y someterse a análisis según la presente invención, siempre que se entienda que la presente invención comprende un método por el cual la misma sección de muestra de tejido se analiza a niveles tanto morfológicos como moleculares, o se analiza con respecto tanto a proteína como a ácido nucleico.

**[0081]** Por "correlacionar" o "que se correlacionan" se indica comparar, de cualquier forma, el rendimiento y/o los resultados de un primer análisis o protocolo con el rendimiento y/o los resultados de un segundo análisis o protocolo. Por ejemplo, los resultados de un primer análisis o protocolo pueden usarse en la realización de un segundo protocolo y/o los resultados de un primer análisis o protocolo pueden usarse para determinar si debería realizarse o no un segundo análisis o protocolo. Con respecto a la realización de análisis o protocolo de la expresión génica, se pueden usar los resultados del análisis o protocolo de la expresión génica para determinar si debe realizarse una pauta terapéutica específica

**[0082]** La palabra "marcador" cuando se usa en este documento se refiere a un compuesto o composición que está conjugado o fusionado directamente o indirectamente con un reactivo, tal como una sonda de ácido nucleico o un anticuerpo y facilita la detección del reactivo con el que está conjugado o fusionado. El marcador puede ser por sí mismo detectable (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición del sustrato que es detectable.

#### Técnicas generales ilustrativas

**[0083]** Se puede obtener una muestra que comprende una molécula diana mediante métodos conocidos en la técnica y que son apropiados para el tipo particular y la localización de la enfermedad de interés. La biopsia del tejido se utiliza a menudo para obtener una pieza representativa de tejido enfermo. Alternativamente, las células se pueden obtener indirectamente en forma de tejidos/fluidos que son conocidos o se cree que contienen las células enfermas de interés. Por ejemplo, se pueden obtener muestras de lesiones de la enfermedad mediante resección, broncoscopia, aspiración con agujas finas, cepillado bronquial, o de esputo, fluido pleural o sangre. Los genes o productos génicos se pueden detectar a partir del tejido de la enfermedad o de otras muestras del organismo, tales como orina, esputo o suero. Las mismas técnicas descritas anteriormente para la detección de genes o productos génicos dianas en muestras de enfermedad se pueden aplicar a otras muestras del organismo. Las células enfermas se desprenden de las lesiones de la enfermedad y aparecen en dichas muestras del organismo. Mediante el cribado de dichas muestras del organismo, se puede conseguir un diagnóstico simple precoz para estas enfermedades. Además, el progreso de la terapia se puede monitorizar más fácilmente mediante el análisis de dichas muestras del organismo para genes o productos génicos diana.

**[0084]** Los métodos aquí descritos son útiles para detectar cualquier trastorno autoinmune con el que está asociado una activación anormal (por ejemplo, la sobreexpresión) de interferones, en particular interferones Tipo 1 y/o su mecanismo de señalización asociado. Los métodos de diagnóstico de la presente invención son útiles para los médicos, de manera que pueden decidir sobre una evolución apropiada del tratamiento. Por ejemplo, una muestra de un sujeto que expresa un nivel elevado de expresión de los genes o productos génicos descritos

aquí podrían sugerir una pauta terapéutica más agresiva que una muestra que expresa un nivel de expresión comparativamente inferior. Los métodos de la invención se pueden utilizar en un conjunto de disposiciones, por ejemplo, en la ayuda en la selección del paciente durante la evolución del desarrollo del medicamento, la predicción de la probabilidad de éxito cuando se trata un paciente individual con una pauta de tratamiento particular, en la evaluación de la progresión de la enfermedad, en la monitorización de la eficacia del tratamiento, en la determinación del pronóstico para pacientes individuales, en la evaluación de la predisposición de un individuo para desarrollar un trastorno autoinmune particular (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren), en la diferenciación de las etapas de la enfermedad, etc.

**[0085]** Los medios para enriquecer un preparado de tejido para células enfermas son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el tejido se puede aislar de secciones con parafina o cristato. Las células enfermas también se pueden separar de las células normales mediante citometría de flujo o microdissección por captura láser. Estas, así como otras técnicas para separar células enfermas de células normales, son conocidas en la técnica. Si el tejido enfermo está altamente contaminado con células normales, la detección del perfil o firma de expresión génica puede ser más difícil, aunque las técnicas para minimizar la contaminación y/o resultados de falsos positivos/negativos son conocidos, algunos de estas se describen a continuación. Por ejemplo, también se puede evaluar una muestra por la presencia de un biomarcador (incluyendo una mutación) conocido por estar asociado con una célula enferma de interés, pero no una célula normal correspondiente, o viceversa.

**[0086]** Se describe aquí un conjunto de composiciones adecuadas para utilizar en la realización de los métodos de la invención. Por ejemplo, la presente invención proporciona chips (matrices) que se pueden utilizar en dichos métodos. Se describe aquí un chip que comprende moléculas de ácidos nucleicos individuales o por grupos útiles para detectar mutaciones de la invención. Por ejemplo, un chip puede comprender una serie de oligonucleótidos de ácidos nucleicos individuales colocados de manera discreta o grupos de combinaciones de oligonucleótidos de ácidos nucleicos que son hibridables a una muestra que comprende ácidos nucleicos diana, mediante lo cual dicha hibridación es indicativa de la presencia o ausencia de una mutación.

**[0087]** En el sector se conocen varias técnicas para unir ácidos nucleicos a un sustrato sólido, tal como un portaobjetos de vidrio. Un método es incorporar bases modificadas o análogos que contienen un grupo que es capaz de unirse a un sustrato sólido, tal como un grupo amina, un derivado de un grupo amina u otro grupo con una carga positiva, en moléculas de ácido nucleico que se sintetizan. A continuación, el producto sintetizado se pone en contacto con un sustrato sólido, tal como un portaobjetos de vidrio, que está recubierto con un grupo reactivo aldehído u otro grupo reactivo que formará un enlace covalente con el grupo reactivo que está en el producto amplificado y se unirá covalentemente al portaobjetos de vidrio. Otros métodos, tales como aquellos que utilizan química de superficie de sílice con aminopropilo, también son conocidos en la técnica, tal como se describen en <http://www.cmt.coming.com> y <http://cmgm.stanford.edu/pbrownl>.

**[0088]** La unión de grupos a oligonucleótidos que se podrían convertir posteriormente en grupos reactivos también es posible utilizando métodos conocidos en el sector. Cualquier unión a nucleótidos de oligonucleótidos será parte del oligonucleótido, que podría entonces unirse a la superficie sólida del microchip.

**[0089]** Los ácidos nucleicos amplificados se pueden modificar adicionalmente, tal como mediante la separación fragmentos o mediante la unión de marcadores detectables, antes o después de la unión al sustrato sólido, según sea necesario y/o permitido por las técnicas utilizadas.

#### MÉTODOS TÍPICOS Y MATERIALES DE LA INVENCION

**[0090]** Los métodos y ensayos descritos en este documento están dirigidos al examen de la expresión de uno o más biomarcadores en una muestra de tejido o de células de mamífero, donde la determinación de esa expresión de uno o más de dichos biomarcadores es predictiva o indicativa de si la muestra de tejido o de células será sensible o no al tratamiento basado en el uso de inhibidores de interferones. Los métodos y ensayos incluyen aquellos que examinan la expresión de biomarcadores, tales como uno o más de los listados en las tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6, y/o 7.

**[0091]** Tal como se ha descrito anteriormente, existen algunas poblaciones de tipos de células humanas enfermas que están asociadas con la expresión anormal de interferones, tales como interferones de Tipo 1 que está asociada con varios trastornos autoinmunes. Por tanto, se cree que los métodos y ensayos descritos pueden proporcionar medios convenientes, eficientes y potencialmente rentables para obtener datos e información útil en la evaluación de terapias apropiadas o eficaces para tratar pacientes. Por ejemplo, en un paciente que ha sido diagnosticado con una afección relacionada con la inmunidad podría realizarse una biopsia para obtener una muestra de tejido o de células, y la muestra podría examinarse mediante diversos ensayos *in vitro* para determinar si las células del paciente serían sensibles o no a un agente terapéutico, tal como un inhibidor de interferones (por ejemplo, un anticuerpo anti-interferón alfa o un anticuerpo para el receptor de interferón alfa).

**[0092]** Se describen aquí métodos para predecir la sensibilidad de una muestra de tejido o de células de

mamífero (tal como una célula asociada con un trastorno autoinmune) a un inhibidor de interferones. En los métodos, se obtiene y examina una muestra de tejido o de células para la expresión de uno o más biomarcadores. Los métodos pueden realizarse en una variedad de formas de ensayo que incluyen ensayos que detectan la expresión de ARNm, ensayos enzimáticos que detectan la presencia de actividad enzimática y ensayos inmunohistoquímicos. La determinación de la expresión de dichos biomarcadores en dichos tejidos o células será predictiva de que dichos tejidos o células serán sensibles a la terapia con inhibidores de interferones. Los solicitantes encontraron sorprendentemente que la expresión de dichos biomarcadores particulares se correlaciona estrechamente con la presencia y/o la extensión de varios trastornos autoinmunes.

**[0093]** Tal como se describe más adelante, la expresión de diversos biomarcadores en una muestra puede analizarse mediante varias metodologías, muchas de las cuales se conocen en la técnica y son entendidas por el experto que incluyen, pero no se limitan a, análisis inmunohistoquímico y/o Western, ensayos cuantitativos basados en sangre (como, por ejemplo, ELISA en suero) (para examinar, por ejemplo, niveles de expresión de proteínas), ensayos enzimáticos de actividad enzimática bioquímica, hibridación *in situ*, análisis Northern y/o análisis por PCR de ARNm, además de una cualquiera de la amplia variedad de ensayos que pueden realizarse por análisis de chips de genes y/o tejidos. Los protocolos típicos para evaluar el estado de genes y productos génicos se encuentran, por ejemplo, en Ausubel y col. eds., 1995, Current Protocols In Molecular Biology, Unidades 2 (transferencia Northern), 4 (transferencia Southern), 15 (inmunotransferencia) y 18 (análisis por PCR).

**[0094]** Los protocolos siguientes en relación a la detección de biomarcadores particulares, tales como los listados en las Tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6, y/o 7, en una muestra se proporciona con fines ilustrativos.

**[0095]** Los métodos aquí descritos incluyen protocolos que examinan o analizan la presencia de IRG en una muestra de tejido o de células de mamífero. Puede emplearse una variedad de métodos para detectar IRG e incluyen, por ejemplo, análisis inmunohistoquímico, inmunoprecipitación, análisis de transferencia Western, ensayos de unión molecular, ELISA, ELIFA, citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS) y similares. Por ejemplo, un método opcional de detección de la expresión de IRG en un tejido o muestra comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo de IRG, un fragmento reactivo con IRG del mismo o una proteína recombinante que contiene una región de unión a antígeno de un anticuerpo de IRG; y a continuación detectar la unión de la proteína de IRG en la muestra.

**[0096]** La expresión de proteínas de IRG en una muestra se puede examinar usando protocolos de inmunohistoquímica y tinción. Se ha observado que la tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido es un método fiable de evaluación o detección de la presencia de proteínas en una muestra. Las técnicas de inmunohistoquímica ("IHC") utilizan un anticuerpo para la sonda y visualizan antígenos celulares *in situ*, generalmente por métodos cromogénicos o fluorescentes.

**[0097]** Para la preparación de muestras puede usarse una muestra de tejido o de células de un mamífero (normalmente un paciente humano). Ejemplos de muestras incluyen, pero no se limitan a, biopsia de tejido, sangre, aspirado pulmonar, esputo, fluido linfático, etc. La muestra puede obtenerse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, extirpación quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede ser fresco o congelado. En una realización, la muestra se fija y se incorpora en parafina o similares.

**[0098]** La muestra de tejido puede fijarse (es decir, conservarse) por metodología convencional (véase, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", 3ª edición (1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, Nueva York; The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.). Un experto en la materia entenderá que la elección de un fijador se determina con el fin de que la muestra va a teñirse histológicamente o analizarse de otro modo. Un experto en la materia también entenderá que la duración de la fijación depende del tamaño de la muestra de tejido y el fijador usado. A modo de ejemplo, para fijar una muestra puede usarse formalina tamponada neutra, Bouin o paraformaldehído.

**[0099]** Generalmente, la muestra se fija primero y a continuación se deshidrata mediante una serie ascendente de alcoholes, se filtra y se incorpora en parafina u otros medios de seccionamiento de manera que la muestra de tejido pueda seccionarse. Alternativamente, el tejido puede seccionarse y fijarse las secciones obtenidas. A modo de ejemplo, la muestra de tejido puede incorporarse y procesarse en parafina por metodología convencional (véase por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", arriba). Ejemplos de parafina que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, Paraplast, Broid y Tissuemay. Una vez que se incorpora la muestra de tejido, la muestra puede seccionarse por un microtomo o similares (véase por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", arriba). A modo de ejemplo de este método, las secciones pueden oscilar de aproximadamente tres micrómetros a aproximadamente cinco micrómetros de espesor. Una vez seccionada, las secciones pueden unirse a portaobjetos por varios métodos convencionales. Ejemplos de adhesivos a portaobjetos incluyen, pero

no se limitan a, silano, gelatina, poli-L-lisina y similares. A modo de ejemplo, las secciones incorporadas en parafina pueden unirse a portaobjetos positivamente cargados y/o portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina.

**[0100]** Si la parafina se ha usado como material de incorporación, las secciones de tejido en general se desparafinan y se rehidratan en agua. Las secciones de tejido pueden desparafinarse por varias metodologías estándar convencionales. Por ejemplo, pueden usarse xilenos y una serie gradualmente descendente de alcoholes (véase por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", arriba). Alternativamente pueden usarse agentes no orgánicos desparafinantes comercialmente disponibles tales como Hemo-De7 (CMS, Houston, Texas).

**[0101]** Opcionalmente, posterior a la preparación de muestras, puede analizarse una sección de tejido usando IHC. La IHC puede realizarse en combinación con técnicas adicionales, tales como tinción morfológica y/o hibridación por fluorescencia *in situ*. Existen dos métodos generales de IHC; ensayos directos e indirectos. Según el primer ensayo, la unión de anticuerpo al antígeno diana (por ejemplo, un IRG) se determina directamente. Este ensayo directo usa un reactivo marcado tal como un marcador fluorescente o un anticuerpo primario marcado con enzima que puede visualizarse sin más interacción de anticuerpos. En un ensayo indirecto típico, el anticuerpo primario sin conjugar se une al antígeno y a continuación un anticuerpo secundario marcado se une al anticuerpo primario. Si el anticuerpo secundario está conjugado con un marcador enzimático, se añade un sustrato cromogénico o fluorogénico para proporcionar la visualización del antígeno. La amplificación de señales se produce debido a que varios anticuerpos secundarios pueden reaccionar con diferentes epítomos en el anticuerpo primario.

**[0102]** Los anticuerpos primarios y/o secundarios usados para la inmunohistoquímica normalmente se marcarán con un grupo detectable. Existen numerosos marcadores que pueden agruparse en general en las siguientes categorías:

(a) Radioisótopos, tales como  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  y  $^{131}\text{I}$ . El anticuerpo puede marcarse con el radioisótopo usando las técnicas descritas en Current Protocols in Immunology, volúmenes 1 y 2, Coligen y col.; Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, Nueva York, Pubs. (1991), por ejemplo, y la radiactividad puede medirse usando recuento por centelleo.

(b) Partículas de oro coloidal.

(c) Marcadores fluorescentes que incluyen, pero no se limitan a, quelatos de tierras raras (quelatos de europio), Texas Red, rodamina, fluoresceína, dansilo, Lissamine, umbeliferona, ficoeritrina, ficocianina o fluoróforos comercialmente disponible, tales como SPECTRUM ORANGE7 y SPECTRUM GREEN7 y/o derivados de uno cualquiera o más de los anteriores. Los marcadores fluorescentes pueden conjugarse con el anticuerpo usando, por ejemplo, las técnicas desveladas en Current Protocols in Immunology, arriba. La fluorescencia puede cuantificarse usando un fluorímetro.

(d) Existen diversos marcadores enzima-sustrato y la patente de EE.UU. nº 4.275.149 proporciona una revisión de algunas de éstas. La enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse usando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato que puede medirse espectrofotométricamente. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se describen anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente mediante una reacción química y puede a continuación emitir luz que puede medirse (usando, por ejemplo, un quimioluminómetro) o donar energía a un aceptor fluorescente. Ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; la patente de EE.UU. nº 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, malato-deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido-oxidasas (por ejemplo, glucosa-oxidasa, galactosa-oxidasa y glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina-oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Las técnicas para conjugar enzimas con anticuerpos se describen en O'Sullivan y col., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay en Methods in Enzym. (ed. J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, Nueva York, 73:147-166 (1981).

**[0103]** Ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

(i) Peroxidasa de rábano picante (HRPO) con hidrógeno-peroxidasa como sustrato, donde la hidrógeno-peroxidasa oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortofenilendiamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB));

(ii) fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenilfosfato como sustrato cromogénico; y

(iii)  $\beta$ -D-galactosidasa ( $\beta$ -D-Gal) con sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- $\beta$ -galactosidasa) o sustrato fluorogénico (por ejemplo, 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactosidasa).

**[0104]** Existen numerosas otras combinaciones de enzima-sustrato para aquellos expertos en la materia. Para una revisión general de éstas véanse las patentes de EE.UU. nº 4.275.149 y 4.318.980. Algunas veces, el marcador está indirectamente conjugado con el anticuerpo. El experto será consciente de diversas técnicas para

lograr esto. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de las cuatro amplias categorías de marcadores mencionados anteriormente puede conjugarse con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a avidina y, por tanto, el marcador puede conjugarse con el anticuerpo de esta manera indirecta. Alternativamente, para lograr la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo, el anticuerpo se

**[0105]** Aparte de los métodos de preparación de muestras descritos anteriormente, puede desearse otro tratamiento de la sección de tejido antes de, durante o tras la IHC, por ejemplo, pueden llevarse a cabo métodos de recuperación de epítomos, tales como calentamiento de la muestra de tejido en tampón citrato (véase, por ejemplo, Leong y col. Appl. Immunohistochem. 4(3):201 (1996)).

**[0106]** Tras una etapa de bloqueo opcional, la sección de tejido se expone a anticuerpo primario durante un periodo de tiempo suficiente y bajo condiciones adecuadas de forma que el anticuerpo primario se une al antígeno de proteína diana en la muestra de tejido. Pueden determinarse las condiciones apropiadas para lograr esto mediante experimentación rutinaria. El grado de unión del anticuerpo a la muestra se determina usando uno cualquiera de los marcadores detectables descritos anteriormente. Preferentemente, el marcador es un marcador enzimático (por ejemplo, HRPO) que cataliza una alteración química del sustrato cromogénico, tal como el cromógeno 3,3'-diaminobencidina. Preferentemente, el marcador enzimático se conjuga con el anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo primario (por ejemplo, el anticuerpo primario es anticuerpo policlonal de conejo y el anticuerpo secundario es anticuerpo de cabra anti-conejo).

**[0107]** Opcionalmente, los anticuerpos empleados en el análisis de IHC para detectar la expresión de un IRG son anticuerpos generados para unirse principalmente al IRG de interés. Opcionalmente, el anticuerpo anti-IRG es un anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos anti-IRG están fácilmente disponibles en la técnica, incluyendo a partir de diversas fuentes comerciales, y también se puede generar utilizando conocimiento rutinarios del sector.

**[0108]** Por tanto, las muestras preparadas pueden montarse y cubrirse con cubreobjetos. A continuación, se determina la evaluación del portaobjetos, por ejemplo, usando un microscopio, y pueden emplearse criterios de intensidad de tinción usados normalmente en la técnica. Como ejemplo, los criterios de intensidad de tinción pueden evaluarse del siguiente modo:

TABLA A

| Patrón de tinción                                                          | Puntuación |
|----------------------------------------------------------------------------|------------|
| No se observa tinción en las células                                       | 0          |
| Se detecta tinción débil/apenas perceptible en más del 10% de las células. | 1+         |
| Se observa tinción de débil a moderada en más del 10% de las células.      | 2+         |
| Se observa tinción de moderada a fuerte en más del 10% de las células.     | 3+         |

**[0109]** En métodos alternativos, la muestra puede ponerse en contacto con un anticuerpo específico para dicho biomarcador en condiciones suficientes para que se forme un complejo anticuerpo-biomarcador y a continuación detectar dicho complejo. La presencia del biomarcador puede llevarse a cabo de varias formas, tales como por métodos de transferencia Western y ELISA, para analizar una amplia variedad de tejidos y muestras, que incluyen plasma o suero. Existe un amplio intervalo de técnicas de inmunoensayo que usan dicho formato de ensayo, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.016.043, 4.424.279 y 4.018.653. Éstas incluyen tanto ensayos de un único sitio y de dos sitios como tipo "sándwich" de los tipos no competitivos, además de los ensayos de unión competitiva tradicionales. Estos ensayos también incluyen la unión directa de un anticuerpo marcado a un biomarcador diana.

**[0110]** Los ensayos de tipo sándwich están entre los ensayos más útiles y comúnmente usados. Existen varias variaciones de la técnica de ensayos de tipo sándwich, y todas pretenden estar englobadas por la presente invención. Brevemente, en un ensayo directo típico, un anticuerpo sin marcar se inmoviliza sobre un sustrato sólido, y la muestra que va a probarse se pone en contacto con la molécula unida. A continuación, después de un periodo de incubación adecuado, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de un inmunocomplejo, se añade un segundo anticuerpo específico para el antígeno, marcado con una molécula indicadora que puede producir una señal detectable, y se incuba dejando el tiempo suficiente para la formación de otro complejo de anticuerpo-anticuerpo marcado con antígeno. Cualquier material sin reaccionar se lava, y la presencia del antígeno se determina mediante la observación de una señal producida por la molécula indicadora. Los resultados pueden ser cualitativos, por simple observación de la señal visible, o pueden cuantificarse comparando con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de biomarcador.

**[0111]** Las variaciones en el ensayo directo incluyen un ensayo simultáneo en el que tanto la muestra como el anticuerpo marcado se añaden simultáneamente al anticuerpo unido. Estas técnicas son muy conocidas para

aquellos expertos en la materia, que incluyen cualquier variación mínima tal como será fácilmente evidente. En un ensayo de tipo sándwich directo típico, un primer anticuerpo que tiene especificidad por el biomarcador está tanto covalentemente como pasivamente unido a una superficie sólida. La superficie sólida es normalmente vidrio o un polímero, donde los polímeros más comúnmente usados son celulosa, poli(acrilamida), nylon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tubos, perlas, discos de microplacas o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los métodos de unión son muy conocidos en la técnica y generalmente consisten en reticulación, unión covalente o adsorción física, el complejo polímero-anticuerpo se lava en la preparación para la muestra de prueba. A continuación, se añade una alícuota de la muestra que va a probarse al complejo en fase sólida y se incuba durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, 2-40 minutos o durante la noche si es más conveniente) y bajo condiciones adecuadas (por ejemplo, de temperatura ambiente a 40°C, tal como entre 25°C y 32°C, ambos incluidos) para permitir la unión de cualquier subunidad presente en el anticuerpo. Tras el periodo de incubación, la fase sólida de la subunidad de anticuerpo se lava y se seca y se incuba con un segundo anticuerpo específico para una parte del biomarcador. El segundo anticuerpo se une a una molécula indicadora que se usa para indicar la unión del segundo anticuerpo al marcador molecular.

**[0112]** Un método alternativo implica inmovilizar los biomarcadores diana en la muestra y a continuación exponer la diana inmovilizada a un anticuerpo específico que puede o no marcarse con una molécula informadora. Dependiendo de la cantidad de diana y la intensidad de la señal de la molécula informadora, una diana unida puede ser detectable mediante marcaje directo con el anticuerpo. Alternativamente, se expone un segundo anticuerpo marcado, específico para el primer anticuerpo, al complejo diana-primer anticuerpo para formar un complejo terciario diana-primer anticuerpo-segundo anticuerpo. El complejo se detecta mediante la señal emitida por la molécula informadora. Por "molécula informadora", como se usa en el presente documento, indica una molécula que, por su naturaleza química, proporciona una señal analíticamente identificable que permite la detección del anticuerpo unido a antígeno. Las moléculas informadoras más habitualmente usadas en este tipo de ensayo son tanto enzimas, fluoróforos como moléculas que contienen radionucleidos (es decir, radioisótopos) y moléculas quimioluminiscentes.

**[0113]** En el caso de un inmunoensayo de enzima, se conjuga una enzima con el segundo anticuerpo, generalmente mediante glutaraldehído o peryodato. Sin embargo, tal como será fácilmente reconocido, existe una amplia variedad de técnicas de conjugación diferentes que están fácilmente disponibles para el experto. Las enzimas comúnmente usadas incluyen peroxidasa de rábano picante, glucosa-oxidasa, glucosa-galactosidasa y fosfatasa alcalina, entre otras. Los sustratos que van a usarse con las enzimas específicas se eligen generalmente para la producción, tras la hidrólisis por la enzima correspondiente, de un cambio de color detectable. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen fosfatasa alcalina y peroxidasa. También es posible emplear sustratos fluorogénicos que producen un producto fluorescente en lugar de los sustratos cromogénicos indicados anteriormente. En todos los casos, el anticuerpo marcado con enzima se añade al primer complejo anticuerpo-marcador molecular, se deja que se unan, y a continuación se lava el reactivo en exceso. A continuación, se añade al complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo una disolución que contiene el sustrato apropiado. El sustrato reaccionará con la enzima ligada al segundo anticuerpo dando una señal visual cualitativa que puede cuantificarse adicionalmente, normalmente espectrofotométricamente, para dar una indicación de la cantidad de biomarcador que estaba presente en la muestra. Alternativamente, los compuestos fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, pueden acoplarse químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Si se activa por iluminación con luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía de la luz, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido de emisión de la luz a un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Como en el EIA, se deja que el anticuerpo marcado fluorescente se una al primer complejo anticuerpo-marcador molecular. Después de eliminarse por lavado el reactivo sin unir, el complejo terciario restante se expone a luz de la longitud de onda apropiada, la fluorescencia observada indica la presencia del marcador molecular de interés. Las técnicas de inmunofluorescencia y EIA están ambas muy bien establecidas en la técnica. Sin embargo, también pueden emplearse otras moléculas informadoras tales como moléculas de radioisótopos, quimioluminiscentes o bioluminiscentes.

**[0114]** Se contempla que las técnicas anteriormente descritas también puedan emplearse para detectar la expresión de IRG.

**[0115]** Se describe aquí protocolos que examinan la presencia y/o expresión de ARNm, tales como ARNm de IRG en una muestra de tejido o de células. Los métodos para la evaluación de ARNm en células son muy conocidos e incluyen, por ejemplo, ensayos de hibridación usando sondas de ADN complementario (tales como hibridación *in situ* usando ribosondas de IRG marcadas, transferencia Northern y técnicas relacionadas) y diversos ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (tales como RT-PCR usando cebadores complementarios específicos para IRG, y otros métodos de detección de tipo amplificación tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA y similares).

**[0116]** Las muestras de tejido o de células de mamíferos pueden analizarse convenientemente para, por ejemplo, ARNm de IRG usando transferencia Northern, transferencia de puntos o análisis de PCR. Por ejemplo, los

ensayos de RT-PCR, tales como los ensayos de PCR cuantitativa, son muy conocidos en la técnica. Se describe aquí un método para detectar un ARNm de IRG en una muestra biológica comprende producir ADNc de la muestra por transcripción inversa usando al menos un cebador; amplificar el ADNc así producido usando un polinucleótido de IRG como cebadores de sentido directo y de sentido contrario para amplificar ADNc de IRG en el mismo; y detectar la presencia del ADNc de IRG amplificado. Además, dichos métodos pueden incluir una o más etapas que permiten determinar los niveles de ARNm de IRG en una muestra biológica (por ejemplo, examinando simultáneamente los niveles en la secuencia de ARNm de control comparativa de un gen "constitutivo" tal como un miembro de la familia de actina). Opcionalmente puede determinarse la secuencia del ADNc de IRG amplificado.

**[0117]** Se describe aquí cebadores de IRG y pares de cebadores que permiten la amplificación específica de los polinucleótidos aquí descritos o de cualquier parte específica de los mismos, y sondas que se hibridan selectivamente o específicamente con moléculas de ácidos nucleicos aquí descritos o con cualquier parte de los mismos. Las sondas pueden marcarse con un marcador detectable tal como, por ejemplo, un radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, quelante metálico o enzima. Dichas sondas y cebadores pueden usarse para detectar la presencia de polinucleótidos de IRG en una muestra y como medio para detectar una célula que expresa proteínas de IRG. Como entenderá el experto en la materia, pueden prepararse muchísimos cebadores y sondas diferentes basándose en las secuencias proporcionadas en este documento y usadas eficazmente para amplificar, clonar y/o determinar la presencia y/o niveles de ARNm de IRG.

**[0118]** Se describen aquí protocolos que examinan o detectan ARNm, tales como ARNm de IRG, en una muestra de tejido o de células, mediante tecnologías de microchips. Usando microchips de ácido nucleico, se transcriben inversamente muestras de ARNm de prueba y de control de muestras de tejido de prueba y de control y se marcan para generar sondas de ADNc. Las sondas se hibridan a continuación con un chip de ácidos nucleicos inmovilizado sobre un soporte sólido. El chip está configurado de forma que se conozca la secuencia y posición de cada miembro del chip. Por ejemplo, una selección de genes que tiene posibilidad de expresarse en ciertos estados patológicos puede disponerse en chips sobre un soporte sólido. La hibridación de una sonda marcada con un miembro del chip particular indica que la muestra de la que se derivó la sonda expresa ese gen. El análisis de expresión génica diferencial de tejido enfermo puede proporcionar valiosa información. La tecnología de microchips utiliza técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y tecnología de computación para evaluar la expresión del perfil de ARNm de miles de genes en un único experimento (véase, por ejemplo, documento WO 01/75166 publicado el 11 de octubre de 2001; véanse, por ejemplo, el documento US 5.700.637, la patente de EE.UU. 5.445.934 y la patente de EE.UU. 5.807.522, Lockart, Nature Biotechnology, 14:1675-1680 (1996); Cheung, V.G. et al., Nature Genetics 21(Suppl):15-19 (1999) para una discusión de la fabricación de chips). Los microchips de ADN son chips en miniatura que contienen fragmentos génicos que se sintetizan directamente o se aplican en puntos sobre vidrio u otros sustratos. Normalmente se representan miles de genes en un único chip. Un experimento de microchips típico implica las siguientes etapas: 1) preparación de diana marcada fluorescentemente de ARN aislado de la muestra, 2) hibridación de la diana marcada con el microchip, 3) lavado, tinción y barrido del chip, 4) análisis de la imagen barrida y 5) generación de perfiles de expresión génica. Actualmente se están usando dos tipos principales de microchips de ADN: chips de oligonucleótidos (normalmente 25 a 70 unidades) y chips de expresión génica que contienen productos de PCR preparados a partir de ADNc. En la formación de un chip, los oligonucleótidos pueden ser tanto prefabricados como aplicados por puntos a la superficie o sintetizarse directamente sobre la superficie (*in situ*).

**[0119]** El sistema Affymetrix GeneChip® es un sistema de micromatrices comercialmente disponible que comprende matrices fabricadas mediante síntesis directa de oligonucleótidos sobre una superficie de vidrio. Matrices de sondas/genes: los oligonucleótidos, normalmente de 25 unidades, se sintetizan directamente sobre una oblea de vidrio mediante una combinación de fotolitografía basada en semiconductores y tecnologías químicas de síntesis en fase sólida. Cada matriz contiene hasta 400.000 oligonucleótidos diferentes y cada oligonucleótido está presente en millones de copias. Como las sondas de oligonucleótidos se sintetizan en localizaciones conocidas sobre la matriz, los patrones de hibridación y las intensidades de señal pueden interpretarse en términos de identidad génica y niveles relativos de expresión por el software Affymetrix Microarray Suite. Cada gen está representado sobre la matriz por una serie de sondas de oligonucleótidos diferentes. Cada par de sondas consiste en un oligonucleótido de apareamiento perfecto y un oligonucleótido de desapareamiento. La sonda de apareamiento perfecto tiene una secuencia exactamente complementaria al gen particular y, por tanto, mide la expresión del gen. La sonda de desapareamiento se diferencia de la sonda de apareamiento perfecto en una única sustitución de bases en la posición de bases central, alterando la unión del transcrito del gen diana. Esto ayuda a determinar la hibridación de base y no específica que contribuye a la señal medida para el oligonucleótido de apareamiento perfecto. El software Microarray Suite resta las intensidades de hibridación de las sondas de desapareamiento de aquellas de las sondas de apareamiento perfecto para determinar el valor de intensidad absoluto o específico para cada conjunto de sondas. Las sondas se eligen basándose en la actual información de Genbank y otros repositorios de nucleótidos. Se cree que las secuencias reconocen regiones únicas del extremo 3' del gen. Se usa un GeneChip Hybridization Oven para llevar a cabo la hibridación de hasta 64 matrices a la vez. La estación hidráulica realiza el lavado y la tinción de las matrices de sondas. Está completamente automatizada y contiene cuatro módulos, conteniendo cada módulo una matriz de

sondas. Cada módulo está controlado independientemente por el software Microarray Suite usando protocolos hidráulicos previamente programados. El escáner es un escáner de fluorescencia láser confocal que mide la intensidad de fluorescencia emitida por el ARNc marcado unido a las matrices de sondas. El terminal de trabajo informático con el software Microarray Suite controla la estación hidráulica y el escáner. El software Microarray Suite puede controlar hasta ocho estaciones hidráulicas usando protocolos de hibridación previamente programados, de lavado y de tinción para la matriz de sondas. El software adquiere y convierte los datos de intensidad de hibridación en una llamada de presencia/ausencia para cada gen usando algoritmos apropiados. Finalmente, el software detecta cambios en la expresión génica entre experimentos por análisis de comparación y formatea las salidas en archivos .txt que pueden usarse con otros programas informáticos para el análisis de datos adicional.

**[0120]** La expresión de un biomarcador seleccionado también puede evaluarse examinando la delección génica o amplificación génica. La delección o amplificación génica puede medirse mediante una cualquiera de una amplia variedad de protocolos conocidos en la técnica, por ejemplo, por transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción de ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)), transferencia puntual (análisis de ADN) o hibridación *in situ* (por ejemplo, FISH) usando una sonda apropiadamente marcada, métodos citogenéticos o hibridación genómica comparativa (CGH) usando una sonda apropiadamente marcada. A modo de ejemplo, estos métodos pueden emplearse para detectar la delección de la amplificación de los genes IRG.

**[0121]** La expresión de un biomarcador seleccionado en una muestra de tejido o de células también puede examinarse mediante ensayos funcionales o basados en actividad. Por ejemplo, si el biomarcador es una enzima, pueden realizarse ensayos conocidos en la técnica para determinar o detectar la presencia de la actividad enzimática determinada en la muestra de tejido o de células.

**[0122]** En los métodos de la presente invención, se contempla que la muestra de tejido o de células también pueda examinarse para la expresión de interferones, tales como interferones Tipo 1 y/o la activación del mecanismo de señalización del interferón Tipo 1, en la muestra. El examen de la muestra de tejido o de células para la expresión de interferones Tipo1 y/o el correspondiente receptor o receptores, y/o la activación del mecanismo de señalización del interferón Tipo 1, puede proporcionar información adicional sobre si la muestra de tejido o de células será sensible a un inhibidor de interferón. A modo de ejemplo, las técnicas de IHC descritas anteriormente pueden emplearse para detectar la presencia de una o más de dichas moléculas en la muestra. Se contempla que en métodos en los que un tejido o muestra está siendo examinado no sólo para la presencia de IRG, sino también para la presencia, por ejemplo, de interferón Tipo 1, receptor o receptores de interferón, puedan prepararse portaobjetos separados a partir del mismo tejido o muestra, y probar cada portaobjetos con un reactivo específico para cada biomarcador o receptor específico. Alternativamente, puede prepararse un único portaobjetos a partir de la muestra de tejido o de células, y los anticuerpos dirigidos contra cada biomarcador o receptor pueden usarse en conexión con un protocolo de tinción multicolor para permitir la visualización y detección de los biomarcadores o receptores respectivos.

**[0123]** Posteriormente a la determinación de que la muestra de tejido o de células expresa uno o más de los biomarcadores indicando que la muestra de tejido o de células será sensible al tratamiento con inhibidores de interferones, se contempla pueda administrarse una cantidad eficaz de inhibidor de interferones al mamífero para tratar un trastorno, tal como un trastorno autoinmune que está afectando al mamífero. El médico experto puede realizar el diagnóstico en mamíferos de las diversas afecciones patológicas descritas en este documento. Las técnicas de diagnóstico disponibles en la técnica permiten, por ejemplo, el diagnóstico o la detección de una enfermedad relacionada con el sistema autoinmune en un mamífero.

**[0124]** Un inhibidor de interferón se puede administrar según métodos conocidos, tales como administración intravenosa como un bolo o mediante perfusión continua durante un periodo de tiempo, mediante rutas intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o por inhalación. Opcionalmente, la administración se puede realizar a través de perfusión con minibombas utilizando varios dispositivos disponibles comercialmente.

**[0125]** Las dosificaciones eficaces y los programas para administrar inhibidores de interferón pueden determinarse empíricamente, y el hacer tales determinaciones está dentro de la capacidad de los expertos en la materia. Pueden emplearse dosificaciones únicas o múltiples. Actualmente se cree que una dosificación o cantidad eficaz de inhibidor de interferón usada sola puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal o más por día. El escalado entre especies de las dosificaciones puede realizarse de un modo conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en Mordenti y col., Pharmaceut. Res., 8:1351 (1991).

**[0126]** Cuando se utiliza la administración *in vivo* de interferón, las cantidades de dosificación normal pueden variar de aproximadamente 10 ng/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal del mamífero o más por día, preferentemente de aproximadamente 1 µg/kg/día a 10 mg/kg/día, dependiendo de la vía de administración. La orientación de las dosificaciones particulares y los métodos de administración se proporciona en la bibliografía;

véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 4.657.760; 5.206.344; o 5.225.212. Se anticipa que las diferentes formulaciones serán eficaces para diferentes compuestos de tratamiento y diferentes trastornos, que la administración que elige como diana, por ejemplo, un órgano o tejido puede necesitar la administración de un modo diferente al de otro órgano o tejido.

**[0127]** Se contempla que se pueden utilizar terapias adicionales en los métodos. La terapia o terapias pueden incluir, pero no se limitan a, administración de esteroides y otros estándar de pautas de cuidado para el trastorno autoinmune particular en cuestión. Se contempla que tales otras terapias puedan emplearse como un agente separado del inhibidor de interferón.

**[0128]** Para el uso en las aplicaciones descritas o sugeridas anteriormente pueden usarse kits o artículos de fabricación. Dichos kits pueden comprender un medio portador que está compartimentalizado para recibir en confinamiento cerrado uno o más medios de recipiente, tales como viales, tubos y similares, comprendiendo cada medio de recipiente uno de los elementos separados que van a usarse en el método. Por ejemplo, uno de los medios de recipiente puede comprender una sonda que está marcada de manera detectable o que puede marcarse de manera detectable. Dicha sonda puede ser un anticuerpo o polinucleótido específico para un gen IRG o mensaje, respectivamente. Si el kit utiliza hibridación de ácidos nucleicos para detectar el ácido nucleico diana, el kit también puede tener recipientes que contienen un nucleótido o nucleótidos para la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana y/o un recipiente que comprende un medio informador, tal como una proteína de unión a biotina, tal como avidina o estreptavidina unida a una molécula informadora, tal como un marcador enzimático, fluorescente o de radioisótopo.

**[0129]** El kit aquí descrito comprenderá normalmente el recipiente descrito anteriormente y uno o varios recipientes que comprenden materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario que incluyen tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas y prospectos con instrucciones para uso. Puede estar presente una etiqueta en el recipiente para indicar que la composición se usa para una terapia específica o aplicación no terapéutica, y también puede indicar indicaciones para su uso tanto *in vivo* como *in vitro*, tales como aquellas descritas anteriormente.

**[0130]** Los kits aquí descritos tienen una serie de realizaciones. Una realización habitual es un kit que comprende un recipiente, una etiqueta en dicho recipiente y una composición contenida dentro de dicho recipiente; incluyendo la composición un anticuerpo primario que se une a una secuencia de polipéptido de IRG, indicando la etiqueta en dicho recipiente que la composición puede usarse para evaluar la presencia de proteínas de IRG en al menos un tipo de célula de mamífero, e instrucciones para usar el anticuerpo de IRG para evaluar la presencia de proteínas de IRG en al menos un tipo de célula de mamífero. El kit puede comprender adicionalmente un conjunto de instrucciones y materiales para preparar una muestra de tejido y aplicar anticuerpo y sonda a la misma sección de una muestra de tejido. El kit puede incluir tanto un anticuerpo primario como secundario, estando el anticuerpo secundario conjugado con un marcador, por ejemplo, un marcador enzimático.

**[0131]** Se describe aquí un kit que comprende un recipiente, una etiqueta en dicho recipiente y una composición contenida dentro de dicho recipiente; incluyendo la composición un polinucleótido que se hibrida con un complemento del polinucleótido de IRG bajo condiciones rigurosas, indicando la etiqueta en dicho recipiente que la composición puede usarse para evaluar la presencia de IRG en al menos un tipo de célula de mamífero, e instrucciones para usar el polinucleótido de IRG para evaluar la presencia de ARN o ADN de IRG en al menos un tipo de célula de mamífero.

**[0132]** Otros componentes opcionales en el kit incluyen uno o más tampones (por ejemplo, tampón de bloqueo, tampón de lavado, tampón de sustrato, etc.), otros reactivos, tales como sustrato (por ejemplo, cromógeno) que está químicamente alterado por un marcador enzimático, disolución de recuperación de epítomos, muestras de control (controles positivos y/o negativos), portaobjeto(s) de control, etc.

**[0133]** Los siguientes son ejemplos de los métodos y composiciones de la invención. Debe entenderse que se pueden realizar otras realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

#### **Materiales y Métodos**

**[0134]** Se analizó la expresión de genes sensibles a IFN- $\alpha$  (IRG) en datos de sangre – células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y glóbulos blancos (WBC) de donantes normales y pacientes con SLE de dos orígenes: una colaboración con Tim Richardson en la University Of Michigan, y Genelogic Corporation.

[0135] Los datos de Richardson se obtuvieron de la siguiente manera: se recogió la sangre de 25 pacientes con SLE y 20 donantes sanos. Se preparó ARN de PBMC mediante centrifugación en gradiente Ficoll estándar y se hibridó a chips HGU133P Affymetrix. Los datos iniciales se procesaron mediante MAS5 Affymetrix para producir Signal.

[0136] Los datos de SLE genealógico se obtuvieron de la siguiente manera: se recogió sangre de 73 pacientes con SLE y 64 controles sanos. Se extrajo ARNm de globina mediante purificación por afinidad y el ARNm restante se hibridó a chips de HGU133 A y B según los protocolos estándar. Los datos iniciales se procesaron mediante algoritmo MAS5 Affymetrix para producir los datos Signal.

[0137] Los datos de microchips se agruparon en dos dimensiones (muestras y grupos de sondas) utilizando el programa informático xcluster (señal pearson de log2) en grupos de sondas con una señal promedio > 100 y un coeficiente de variabilidad superior a 0,2. Los datos agrupados se observaron con el programa software Java Treeview. El análisis numérico se realizó con Excel (Microsoft, Redmond, WA).

## Resultados y Análisis

[0138] El análisis de microchips se realizó en las muestras de SLE Richardson. Las muestras se agruparon claramente mediante la categoría de la enfermedad (SLE o normal) y este patrón era robusto a la variación en los parámetros de filtración de los grupos de sondas ( $50 < \text{señal} < 200$ ,  $0,2 < CV < 0,6$ ). Varios subgrupos de grupos de sondas diferentes estrechamente agrupados mostraron características biológicas comunes obvias. Por ejemplo, un subgrupo estaba altamente enriquecido en genes conocidos por ser específicos para células B, otro para neutrófilos, otro para anticuerpos y otro para IRGs. El subgrupo de IRG mostró un patrón interesante con respecto a las muestras: las muestras normales mostraron todas una expresión baja de IRGs, mientras que las muestras con SLE mostraron un amplio rango de expresión que variaba de tipo normal a extremadamente elevado.

[0139] Los perfiles de expresión de grupos de sondas en un subgrupo estrecho son muy similares, pero no idénticos y la variación entre perfiles muy similares puede ser debida en una parte significativa al ruido de origen biológico o tecnológico. Por ejemplo, algunos genes están representados en el microchip por más de un grupo de sondas, y existen varias parejas de grupos de sondas en el área del subgrupo de IRG que representan la misma expresión génica. En estos casos, los grupos de sondas se agruparon próximos entre sí, algunas veces, pero no siempre, inmediatamente adyacentes. De este modo, parecía que estaba presente un patrón claro y se reflejaba en muchos grupos de sondas, y que el patrón se podría identificar claramente mediante la utilización de datos de varios grupos de sondas a efectos de limitar el efecto del ruido. Sin embargo, los genes que se identificaron se podían utilizar como identificadores genéticos para correlacionarse con la presencia de la enfermedad.

*Desarrollo de un valor métrico que se correlaciona con una enfermedad y la identificación de genes individuales que pueden constituir dicho valor métrico.*

[0140] Se continuó con un intento de medir el patrón mediante el cálculo de un valor métrico único proporciona a los niveles de Signal del subgrupo específico de grupos de sondas. Por ejemplo, a continuación se describe esta estrategia con los grupos de sondas de IRG. El patrón (el perfil agregado de IRGs) se definió en primer lugar de manera aproximada mediante la estimación visual de un grupo de grupos de sondas que aparecían en Treeview para ser el grupo que contenía el patrón más que cualquier otro patrón y más que cualquier ruido. Este grupo era de grupos de doscientas sondas que incluían o agrupaban alrededor del núcleo la pareja mejor correlacionada de grupos de sondas en el subgrupo.

[0141] Los datos de expresión de este grupo se transformaron a continuación en valoraciones z (promedio escalado a 1, transformado en log de base 2, a continuación escalado a una desviación estándar del promedio de 1), y se calculó el coeficiente de correlación de cada perfil del grupo de sondas al perfil promedio. Estos coeficientes de correlación se utilizaron como factores de ponderación para ponderar de manera relativamente importante los grupos de sondas que mostraron el emparejamiento más fuerte de la tendencia del grupo y para ponderar relativamente poco aquellos que aparentemente estaban más afectadas por otros factores o ruido.

[0142] Los factores requeridos para escalar los grupos de sondas a 1 se multiplicaron por el factor de ponderación, para producir un factor compuesto que podría producir un valor métrico ponderado normalizado para un punto de los datos. Las firmas de las muestras de sangre normal se multiplicaron por ese factor, se promediaron para los grupos de sondas y las muestras y este número se invirtió para producir un factor de escalado global que transformaría la salida del promedio de los grupos de sondas de una muestra en un valor métrico que se esperaría que fuera 1 si era normal. Cada factor de normalización/ponderación se multiplicó por este factor. El resultado es un vector de valores escalares que se multiplican por una firma de expresión de la muestra y se promedian para producir el valor métrico génico de respuesta a interferón Tipo I (IRGM), un valor métrico individual que mide el nivel de respuesta transcripcional de IFN-alfa en una muestra. El número de grupos de sondas que se utilizó en este valor métrico era inferior que el grupo original de doscientas que

originalmente ayudaron a definirlo. Se utilizaron habitualmente veinticuatro grupos de sondas (tabla 1), aunque se analizaron grupos de ocho a cien y funcionaron bien.

**[0143]** Para los objetivos de validación, se determinó el IRGM para grupos de muestras biológicas de tipo de tejido similar (es decir, sangre completa, biopsia de toda la piel, etc.) y se extrajeron de múltiples grupos que incluían por lo menos un grupo enfermo y un grupo normal. Las muestras analizadas no contenían ninguna de las muestras utilizadas para generar los parámetros de IRGM. Los valores métricos medidos para diferentes grupos se compararon entre sí mediante su combinación en una única lista ordenada por categorías y la evaluación del grado en el que las muestras de un grupo particular se segregan a una parte particular de la lista.

**[0144]** Los valores IRGM se calcularon y evaluaron para un grupo de muestras completamente diferentes de las utilizadas para la selección de los genes IRGM y análisis de los parámetros de prueba. Las muestras de PBMC y sangre completa de pacientes sanos o pacientes que sufren SLE mostraron una separación muy clara (figura 1): los pacientes sanos presentaban un IRGM relativamente bajo, y estrechamente agrupados, mientras que los pacientes de SLE variaban de manera bastante uniforme desde el extremo superior del intervalo normal hasta 40. La enfermedad de Wegener, la nefropatía de IgA (figura 2), la artritis reumatoide mostraron todas una separación leve con valores máximos de las muestras de enfermedad entre 5 y 10. Las muestras de sangre psoriasis mostraron patrones similares pero una separación menos marcada, con IRGM máximos alrededor de 7. Las biopsias de piel psoriática fueron significativamente elevadas en comparación con las biopsias de piel no lesionada de pacientes con psoriasis y con las biopsias de piel de donantes sanos (figura 3).

**[0145]** Para varios genes en el vector del grupo de sondas IRGM existe más de un grupo de sondas que los representa, dando una oportunidad para evaluar si una variación técnica entre grupos de sondas ejerce un efecto significativo en los datos de expresión observados. Se observó que los miembros de cada una de estas parejas de grupos de sondas mostraban perfiles de expresión altamente correlacionados entre sí en relación con la magnitud de sus perfiles individuales y se agrupaban de manera muy próxima en relación con los grupos de sondas de otros genes. Esta observación indica que los datos son mediciones precisas de expresión génica y que las cuestiones técnicas relacionadas con la selección de sondas y el diseño de grupos de sondas presentan como máximo un efecto negativo menor.

**[0146]** Las mediciones clínicas de la actividad y gravedad de la enfermedad SLE, tal como SLEDAI, cuantifican los síntomas de la enfermedad del paciente y se pueden correlacionar con la expresión de genes que subyacen en la etiología de la enfermedad. A efectos de investigar esta hipótesis, se compararon los datos de IRGM en pacientes individuales con las valoraciones de SLEDAI de pacientes. Aunque en general la correlación parecía ser relativamente débil ( $R = 0,2125$ ), la correlación era estadísticamente significativa. De hecho, la correlación se confirmó mediante la observación de que la interacción era más fuerte cuando las valoraciones de SLEDAI se agrupaban en tres categorías iguales y se analizó la diferencia entre las categorías (Figura 4).

**[0147]** La prueba de IRGM y la expresión de los genes que forman dicho test (tal como se establece en la Tabla 1) podría ser útil para seleccionar pacientes que se beneficiarían del tratamiento basado en IFN- $\alpha$  para trastornos autoinmunes (por ejemplo, SLE) mediante la identificación de pacientes que presentaban un valor IRGM relativamente elevado y, por tanto, presentaban una señalización de IFN- $\alpha$  que podría bloquearse. De manera equivalente, se podía utilizar para predecir que ciertos pacientes no se beneficiarían del tratamiento en base a IFN- $\alpha$  porque no se muestra un valor de IRGM elevado y, de este modo, que no experimentarían actualmente una señalización de IFN- $\alpha$  activa que podía alterarse.

**[0148]** La prueba de IRGM y la expresión de los genes que forman dicho test (tal como se establece en la Tabla 1) son indicadores útiles en una variedad de disposiciones en el desarrollo de fármacos, diagnóstico, pronóstico y terapéuticos tal como se describe anteriormente. Por ejemplo, esta información podría utilizarse para comprobar si los pacientes que han respondido bien al tratamiento con anti-IFN- $\alpha$  presentaban niveles elevados de expresión de las dianas de señalización de IFN- $\alpha$  antes del tratamiento y después si el tratamiento derogó esa expresión. Sería una buena estimación de la extensión en que un tratamiento particular afecta al mecanismo de señalización de IFN- $\alpha$ . Podría ser un marcador biodinámico o farmacodinámico útil que mide el perfil de los efectos del tratamiento con el tiempo.

#### Otros interferones

**[0149]** La estrategia basada en la métrica descrita anteriormente podría utilizarse en una variedad de formas en la caracterización de los mecanismos de la enfermedad, los mecanismos de acción y la farmacodinámica del fármaco. Por ejemplo, diferentes moléculas de interferón presentan probablemente diferentes propiedades al IRGM y/o una prueba realizada de la misma manera basada en datos de diferentes microchips y/o análisis que podrían ayudar a medir y elucidar. Por ejemplo:

1) Los interferones de Tipo I señalan todos a través del mismo receptor heterodimérico, pero pueden diferir en su vida media, la afinidad del receptor o el poder de iniciar la señalización en una célula diana. Estas diferencias en

las magnitudes se podrían medir fácilmente y de manera precisa mediante IRGM. Este tipo de medición se podría llevar a cabo en un experimento de cultivo celular o en dispositivo clínico. Asimismo, se podía evaluar el efecto de los fármacos candidatos o los fármacos utilizados en dispositivos clínicos utilizando esta estrategia.

- 5 2) Se podrían construir pruebas de tipo IRGM diferentes mediante ensayos de microchips de muestras de sangre cultivadas tratadas con diferentes interferones. Siempre que las pruebas difieran entre sí, se podrían aplicar a muestras clínicas para determinar las actividades relativas de diferentes interferones y/o fármacos.

#### Otras firmas

- 10 [0150] El método utilizado para generar la prueba de IRGM también se podía aplicar a cualquier tipo de firma de expresión, ya sea de un estado o actividad de células o de un tipo de célula o células. Por ejemplo, existen cambios transcripcionales particulares asociados con replicación celular mitótica activa. Estos cambios transcripcionales se podrían consolidar en una prueba que se aplicaría a una variedad de muestras biológicas para medir cómo se dividen de manera activa. O, en otro ejemplo, los genes cuya expresión es específica para tipos particulares de células inmunes se podrían clasificar por el tipo de célula que los expresa y, a continuación, se podría hacer una prueba para cada tipo de célula. Esta colección de pruebas se podría aplicar entonces a cualquiera de una variedad de muestras clínicas (sangre de pacientes con SLE, biopsias intestinales de pacientes con la enfermedad de Crohn, etc.) para determinar el equilibrio de tipos de células inmunes.

20 Tabla 1. Grupos de sondas, identificados únicos de la base de datos, y nombres correspondientes con genes que tienen una expresión incrementada. Estos grupos de sondas también se utilizaron para generar una única prueba de valor métrico (también descrita como la prueba IRGM de la presente invención).

| Grupo de sondas | Símbolo    | Ref Sec ID (símbolos) | Nombre                                                                   |
|-----------------|------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| 226702_at       | AFAR17068  | NM_207315 (THYK1)     | similar a miembros de la familia de timidilato quinasa inducible por LPS |
| 223220_s_at     | BAL        | NM_031458 (PARP9)     | gen de linfoma agresivo B                                                |
| 219863_at       | ERRS16511  | NM_016323 (HERC5)     | proteína 1 de unión a ciclina-E (LOC51191)                               |
| 242625_at       | CIG5       | NM_080657 (RSAD2)     | Cig5                                                                     |
| 208436_s_at     | IRF7       | NM_004029 (IRF7)      | factor regulador de interferon 7 (IRF7)                                  |
| 204747_at       | IFIT4      | NM_001549 (IFIT3)     | proteína de tetratricopéptidos inducida por Interferón IFI60 (IFIT4)     |
| 213797_at       | CIG5       | NM_080657 (RSAD2)     | Cig5                                                                     |
| 202086_at       | MX1        | NM_002462 (MX1)       | Resistencia a gripe de Mixovirus 1                                       |
| 213294_at       | WTFCF34654 | BG283489 (PRKR)       | FLJ38348                                                                 |
| 227609_at       | BRESI1     | NM_001002264 (EPSTI1) | Posible proteína de interacción estromal epithelial de mama              |
| 205483_s_at     | Isg15      | NM_005101 (G1P2)      | proteína estimulada por interferon (15 kDa)                              |
| 218943_s_at     | RIG-1      | NM_014314 (DDX58)     | AF038963                                                                 |
| 202446_s_at     | P37        | NM_021105 (PLSCR1)    | Fosfolípido escramblasa P37                                              |
| 214453_s_at     | MTAP44     | NM_006417 (IFI44)     | Agg microtubular asociada hepatitis C inducida por interferón            |
| 219356_s_at     | HSPC177    | NM_016410 (SNF7DC2)   | proteína modificadora de cromatina 5                                     |
| 203595_s_at     | RI58       | NM_012420 (IFIT5)     | proteína inducible por ácido retinoico e interferón (58kD)               |
| 204439_at       | VERC16692  | NM_006820 (IFI44L)    | marco de lectura abierto 29 de cromosoma 1                               |
| 218400_at       | OAS3       | NM_006187 (OAS3)      | 2'-5'-oligoadenilato sintetasa 3                                         |
| 209762_x_at     | Sp110      | NM_004509 (SP110)     | coactivador transcripcional Sp110                                        |

|             |           |                      |                                                                         |
|-------------|-----------|----------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 230036_at   | SAMD9L    | NM_152703 (C7orf6)   | de tipo dominio de motivo alfa estéril que contiene 9                   |
| 229450_at   | IFIT4     | NM_001549 (IFIT3)    | proteína de tetratricopéptidos inducida por interferón IFI60 (IFIT4)    |
| 208966_x_at | ANNY16434 | NM_005531 (IFI16)    | clon MGC:23885 IMAGE: 4703266, ARNm, cds completos                      |
| 203153_at   | IFIT1     | NM_001001887 (IFIT1) | Proteína inducida por interferón con repetición de tetratricopéptidos 1 |
| 226603_at   | SAMD9L    | NM_152703 (C7orf6)   | de tipo dominio de motivo alfa estéril que contiene 9                   |

Tabla 2. Un grupo ilustrativo de genes con una expresión aumentada en trastornos autoinmunes

| Grupo de sondas | Símbolo   | Ref Sec ID (símbolos) | Nombre                                                                   |
|-----------------|-----------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| 218400_at       | OAS3      | NM_006187 (OAS3)      | 2'-5'-oligoadenilato sintetasa 3                                         |
| 218943_s_at     | RIG-1     | NM_014314 (DDX58)     | AF038963                                                                 |
| 219356_s_at     | HSPC177   | NM_016410 (SNF7DC2)   | proteína modificadora de cromatina 5                                     |
| 219863_at       | ERRS16511 | NM_016323 (HERC5)     | proteína 1 de unión a ciclina-E (LOC51191)                               |
| 223220_s_at     | BAL       | NM_031458 (PARP9)     | gen de linfoma agresivo B                                                |
| 226603_at       | SAMD9L    | NM_152703 (C7orf6)    | de tipo dominio de motivo alfa estéril que contiene 9                    |
| 226702_at       | AFAR17068 | NM_207315 (THYK1)     | similar a miembros de la familia de timidilato quinasa inducible por LPS |
| 227609_at       | BRESI1    | NM_001002264 (EPSTI1) | posible proteína de interacción estromal epitelial de mama               |
| 230036_at       | SAMD9L    | NM_152703 (C7orf6)    | de tipo dominio de motivo alfa estéril que contiene 9                    |

## 5 Ejemplo 2

[0151] La estrategia utilizada en el Ejemplo 1 para definir sondas y genes a utilizar como marcadores de la firma de interferones de tipo I se extendió a continuación para identificar 78 sondas (49 genes) como marcadores de firma de interferones tipo I y para ilustrar su utilidad en el diagnóstico de pacientes con enfermedad autoinmune (tales como aquellos con SLE) basado en los niveles de expresión de estos genes en las muestras de pacientes.

### Materiales y Métodos

[0152] Los datos de los microchips se obtuvieron de la siguiente manera: se recogió sangre de 76 pacientes con SLE y 46 controles sanos. Se extrajo ARNm de globina mediante purificación por afinidad y el ARNm restante se hibridó a chips de HGU133 A y B según los protocolos estándar. Los datos iniciales se procesaron mediante algoritmo MAS5 Affymetrix para producir los datos Signal.

[0153] Los datos de microchips se agruparon en dos dimensiones (muestras y grupos de sondas) utilizando el programa informático xcluster (señal de pearson de log2) en grupos de sondas con una señal promedio > 100 y un coeficiente de variabilidad superior a 0,2. Los datos agrupados se observaron con el programa software Java Treeview. El análisis numérico se realizó con R. "R" es un proyecto de base comunitaria de origen abierto con las siguientes características: título = R: A Language and Environment for Statistical Computing; autor = R Development Core Team; organización = R Foundation for Statistical Computing; dirección = Viena, Austria; año = 2006; nota = ISBN 3-900051-07-0.

### Resultados y análisis

[0154] Se identificaron genes inducidos por el interferón Tipo I de la anotación del banco de genes y varias fuentes de la literatura. Estos genes se localizaron en las sondas Affymatrix y se representó su densidad a lo largo de un grupo global de datos de microchips de células de sangre completa de control sano y con SLE con un ancho de banda de 30 (figura 5). La curva de densidad de estas sondas reveló una distribución amplia pero

poco densa con un grupo único muy denso de sondas en la región del grupo que definía la clara separación de muestras en las muestras con SLE y las de control sanas por su sobremodulación marcada en las muestras con SLE. Las sondas en el máximo de la región muy densa se correlacionaban de manera relativamente elevada en sus patrones de expresión. El grupo de sondas que diagnostican de manera óptima la firma por inducción de interferón tipo I en SLE se definió como aquellas que contienen el máximo de la curva de densidad y que incluyen todas las sondas que se unieron con un coeficiente de correlación superior a 0,9 (tabla 3).

**[0155]** El valor métrico génico de respuesta a interferón Tipo I (IRGM) se calculó para cada muestra de sangre tal como se ha descrito previamente, pero en base al grupo de genes presentados en la Tabla 3. El test t de Student muestra la diferencia amplia (mayor de 6 veces) y significativa (valor p inferior a 0,0001) entre el promedio de los dos grupos (figura 6). Una representación de distribuciones de los dos grupos de muestras contra los cuantiles normales muestra diferencias en sus distribuciones (figura 7). La distribución de las muestras de control parece ser muy baja y normal logarítmicamente con varios valores atípicos por encima, mientras que las muestras se distribuyen de manera por igual (linealmente) a lo largo de un rango amplio del rango de controles sanos hasta niveles muy elevados. Esta amplio esparcimiento de valores IRGM podría soportar un diagnóstico robusto para diferentes categorías de estado patológico o tipo de SLE.

Tabla 3. Grupos de sondas, identificadores único de bases de datos, símbolos y nombres correspondientes a genes que muestran un patrón de expresión inducida por interferón en muestras de SLE y muestras de control de personas sanas.

| Sonda       | Acceso a la base de datos | Símbolo   | Nombre                                                                 |
|-------------|---------------------------|-----------|------------------------------------------------------------------------|
| 213797_at   | NM_080657                 | RSAD2     | dominio del radical S-adenosil metionina que contiene 2                |
| 226702_at   | NM_207315                 | LOC129607 | proteína hipotética LOC129607                                          |
| 214453_s_at | NM_006417                 | IFI44     | proteína inducida por interferón 44                                    |
| 227609_at   | NM_001002264              | EPSTI1    | interacción estromal epitelial 1                                       |
| 242625_at   | NM_080657                 | RSAD2     | dominio del radical S-adenosil metionina que contiene 2                |
| 230036_at   | NM_152703                 | SAMD9L    | de tipo dominio de motivo alfa estéril que contiene 9                  |
| 214059_at   | NM_006417                 | IFI44     | proteína inducida por interferón 44                                    |
| 218400_at   | NM_006187                 | OAS3      | 2'-5'-oligoadenilato sintetasa 3, 100kDa                               |
| 226603_at   | NM_152703                 | SAMD9L    | de tipo dominio de motivo alfa estéril que contiene 9                  |
| 219863_at   | NM_016323                 | HERC5     | dominio hect y RLD 5                                                   |
| 204439_at   | NM_006820                 | IFI44L    | proteína inducida por interferón de tipo 44                            |
| 228617_at   | NM_017523                 | XIAPAF1   | Factor 1 asociado a XIAP, variante de transcrito 1                     |
| 203596_s_at | NM_012420                 | IFIT5     | proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido |
| 204972_at   | NM_001032731              | OAS2      | 2'-5'-oligoadenilato sintetasa 2, 69/71kDa                             |
| 205483_s_at | NM_005101                 | G1P2      | proteína inducible por interferón alfa (clon IFI-15K)                  |
| 219211_at   | NM_017414                 | USP18     | proteasa específica de ubiquitina 18                                   |
| 223220_s_at | NM_031458                 | PARP9     | familia de polimerasa poli (ADP-ribosa), miembro 9                     |
| 205660_at   | NM_003733                 | OASL      | tipo 2'-5'-oligoadenilato sintetasa                                    |
| 204747_at   | NM_001031683              | IFIT3     | proteína inducida por interferón con repeticiones                      |

|             |              |            |                                                                         |
|-------------|--------------|------------|-------------------------------------------------------------------------|
|             |              |            | de tetratricopéptidos                                                   |
| 218943_s_at | NM_014314    | DDX58      | polipéptido de caja DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 58                           |
| 203153_at   | NM_001001887 | IFIT1      | proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido  |
| 205552_s_at | NM_001032409 | OAS 1      | 2',5'-oligoadenilato sintetasa 1, 40/46kDa                              |
| 224701_at   | NM_017554    | PARP14     | familia de polimerasa poli (ADP-ribosa), miembro 14                     |
| 208436_s_at | NM_001572    | IRF7       | factor regulador de interferón 7                                        |
| 210797_s_at | NM_003733    | OASL       | tipo 2'-5'-oligoadenilato sintetasa                                     |
| 203595_s_at | NM_012420    | IFIT5      | proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido  |
| 219062_s_at | NM_017742    | ZCCHC2     | dedo de zinc, dominio CCHC que contiene 2                               |
| 202145_at   | NM_002346    | LY6E       | complejo de antígeno de linfocito 6, locus E                            |
| 209417_s_at | NM_005533    | IFI35      | proteína inducida por interferón 35                                     |
| 222154_s_at | NM_015535    | DPTP6      | proteína D polimerasa transactivada 6                                   |
| 219356_s_at | NM_016410    | CHMP5      | proteína modificadora de cromatina 5                                    |
| 219352_at   | NM_001013000 | HERC6      | dominio hect y RLD 6                                                    |
| 218543_s_at | NM_022750    | PARP12     | familia de polimerasa poli (ADP-ribosa), miembro 12                     |
| 228607_at   | NM_001032731 | OAS2       | 2'-5'-oligoadenilato sintetasa 2, 69/71kDa                              |
| 226757_at   | NM_001547    | IFIT2      | proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptidos |
| 202446_s_at | NM_021105    | PLSCR1     | fosfolípido escramblasa 1                                               |
| 219684_at   | NM_022147    | TMEM7      | proteína transmembrana 7                                                |
| 232222_at   | NM_017742    | ZCCHC2     | dedo de zinc, dominio CCHC que contiene 2                               |
| 208087_s_at | NM_030776    | ZBP1       | Proteína de unión Z-D 1                                                 |
| 229450_at   | NM_001031683 | IFTT3      | proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptidos |
| 225291_at   | NM_033109    | PNPT1      | poliribonucleótido nucleotidiltransferasa 1                             |
| 202086_at   | NM_002462    | MX1        | resistencia a mixovirus 1, proteína inducible por interferón p78        |
| 235276_at   | NM_001002264 | EPSTI1     | interacción estromal epitelial 1 (mama)                                 |
| 219209_at   | NM_022168    | IFIH1      | interferón inducido con helicasa C dominio 1                            |
| 209593_s_at | NM_014506    | TOR1B      | familia de torsina 1, miembro B (torsina B)                             |
| 228230_at   | NM_033405    | PPARAIC285 | complejo 285 del receptor A activado por proliferador peroxisomal       |
| 218986_s_at | NM_017631    | FLJ20035   | proteína hipotética FLJ20035                                            |
| 228531_at   | NM_017654    | SAMD9      | dominio de motivo alfa estéril que contiene 9                           |
| 202869_at   | NM_001032409 | OAS1       | 2',5'-oligoadenilato                                                    |

|             |              |          |                                                                         |
|-------------|--------------|----------|-------------------------------------------------------------------------|
|             |              |          | sintetasa 1, 40/46kDa                                                   |
| 212657_s_at | NM_000577    | IL1RN    | antagonista del receptor de interleuquina 1                             |
| 202687_s_at | NM_003810    | TNFSF10  | superfamilia (ligando) de factor de necrosis tumoral, miembro 10        |
| 239979_at   | NM_001002264 | EPSTI1   | interacción epitelial estromal 1 (mama)                                 |
| 242020_s_at | NM_030776    | ZBP1     | Proteína de unión Z-D 1                                                 |
| 222793_at   | NM_014314    | DDX58    | polipéptido de caja DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 58                           |
| 227807_at   | NM_031458    | PARP9    | familia de polimerasa poli (ADP-ribosa), miembro 9                      |
| 200986_at   | NM_000062    | SERPING1 | inhibidor de serina (o cisteína) proteinasa, clado G, miembro           |
| 223501_at   | NM_006573    | TNFSF13B | superfamilia (ligando) de factor de necrosis tumoral, miembro 13b       |
| 223502_s_at | NM_006573    | TNFSF13B | superfamilia (ligando) de factor de necrosis tumoral, miembro 13b       |
| 217502_at   | NM_001547    | FIT2     | proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptidos |
| 204994_at   | NM_002463    | MX2      | resistencia a mixovirus 2                                               |
| 202863_at   | NM_003113    | HMG1L3   | proteína de I grupo de movilidad elevada 1-tipo 3                       |
| 228439_at   | NM_138456    | BATF2    | factor de transcripción de la cremallera básica de leucina, tipo ATF 2  |
| 218085_at   | NM_016410    | CHMP5    | proteína modificadora de cromatina 5                                    |
| 219691_at   | NM_017654    | SAMD9    | dominio de motivo alfa estéril que contiene 9                           |
| 44673_at    | NM_023068    | SN       | sialoadhesina                                                           |
| 219519_s_at | NM_023068    | SN       | sialoadhesina                                                           |
| 206133_at   | NM_017523    | XIAPAF1  | Factor 1 asociado a XIAP, variante de transcrito 1                      |
| 202430_s_at | NM_021105    | PLSCR1   | fosfolípido escramblasa 1                                               |
| 243271_at   | NM_152703    | SAMD9L   | de tipo dominio de motivo alfa estéril que contiene 9                   |
| 205098_at   | NM_001295    | CCR1     | receptor 1 de quimioquina (motivo C-C)                                  |
| 231577_s_at | NM_002053    | GBP1     | proteína de unión a guanilato 1, inducible por interferón, 67kDa        |
| 202269_x_at | NM_002053    | GBP1     | proteína de unión a guanilato 1, inducible por interferón, 67kDa        |
| 241916_at   | NM_021105    | PLSCR1   | fosfolípido escramblasa 1                                               |
| 205099_s_at | NM_001295    | CCR1     | receptor 1 de quimioquina (motivo C-C)                                  |
| 202270_at   | NM_002053    | GBP1     | proteína de unión a guanilato 1, inducible por interferón, 67kDa        |

Tabla 4. Identificadores únicos de la base de datos y símbolos correspondientes a genes únicos en la lista de genes de la Tabla 3.

| Acceso de la base de datos | Símbolo   |
|----------------------------|-----------|
| NM_2080657                 | RSAD2     |
| NM_207315                  | LOC129607 |

|              |            |
|--------------|------------|
| NM_006417    | IFI44      |
| NM_001002264 | EPSTT1     |
| NM_152703    | SAMD9L     |
| NM_006187    | OAS3       |
| NM_016323    | HBRC5      |
| NM_006820    | IFI44L     |
| NM_017523    | XIAPAF1    |
| NM_012420    | IFIT5      |
| NM_001032731 | OAS2       |
| NM_005101    | GIP2       |
| NM_017414    | USP18      |
| NM_031458    | PARP9      |
| NM_003733    | OASL       |
| NM_001031683 | IFIT3      |
| NM_014314    | DDX58      |
| NM_001001887 | IFIT1      |
| NM_001032409 | OAS1       |
| NM_017554    | PARP14     |
| NM_001572    | IRF7       |
| NM_017742    | ZCCHC2     |
| NM_002346    | LY6E       |
| NM_005533    | IFI35      |
| NM_015535    | DPTP6      |
| NM_016410    | CHMP5      |
| NM_001013000 | HERC6      |
| NM_022750    | PARP12     |
| NM_001547    | IFIT2      |
| NM_021105    | PLSCR1     |
| NM_022147    | TMEM7      |
| NM_030776    | ZBP1       |
| NM_033109    | PNPT1      |
| NM_002462    | MX1        |
| NM_022168    | IFIH1      |
| NM_014506    | TOR1B      |
| NM_033405    | PPARAIC285 |
| NM_017631    | FLJ20035   |
| NM_017654    | SAMD9      |
| NM_000577    | IL1RN      |
| NM_003810    | TNFSF10    |
| NM_000062    | SERPING1   |
| NM_006573    | TNFSF13B   |
| NM_002463    | MX2        |
| NM_003113    | HMG1L3     |
| NM_138456    | BATF2      |
| NM_023068    | SN         |
| NM_001295    | CCR1       |
| NM_002053    | GBP1       |

Tabla 5. Identificadores únicos de la base de datos y símbolos correspondientes a la lista de genes de la Tabla 4 pero con los genes de la Tabla 1 eliminados.

| Acceso de la base de datos | Símbolo |
|----------------------------|---------|
| NM_017523                  | XIAPAP1 |
| NM_001032731               | OAS2    |
| NM_017414                  | USP18   |
| NM_003733                  | OASL    |
| NM_001032409               | OAS1    |
| NM_017554                  | PARP14  |
| NM_017742                  | ZCCHC2  |
| NM_002346                  | LY6E    |
| NM_005533                  | IFI35   |
| NM_015535                  | DPTP6   |
| NM_001013000               | HERC6   |

|           |            |
|-----------|------------|
| NM_022750 | PARP12     |
| NM_001547 | IFIT2      |
| NM_022147 | TMEM7      |
| NM_030776 | ZBP1       |
| NM_033109 | PNPT1      |
| NM_022168 | IFIH1      |
| NM_014506 | TOR1B      |
| NM_033405 | PPARAIC285 |
| NM_017631 | FLJ20035   |
| NM_017654 | SAMD9      |
| NM_000577 | IL1RN      |
| NM_003810 | TNFSF10    |
| NM_000062 | SERPING1   |
| NM_006573 | TNFSF13B   |
| NM_002463 | MX2        |
| NM_003113 | HMG1L3     |
| NM_138456 | BATF2      |
| NM_023068 | SN         |
| NM_001295 | CCR1       |
| NM_002053 | GBP1       |

Tabla 6. Identificadores únicos de la base de datos y nombres de la combinación de genes de las tablas anteriores.

| Acceso de la base de datos | Nombre                                                                    |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| NM_207315 (THY1)           | similar a miembros de la familia de timidilato quinasa inducible por LPS  |
| NM_031458 (PARP9)          | gen de linfoma agresivo B                                                 |
| NM_016323 (HERC5)          | proteína de unión a ciclina-E 1 (LOC51191)                                |
| NM_080657 (RSAD2)          | Cig5                                                                      |
| NM_004029 (IRF7)           | factor regulador de interferón 7 (IRF7)                                   |
| NM_001S49 (IFTT3)          | proteína tetratricopéptido inducida por interferón IFI60 (IFIT4)          |
| NM_002462 (MX1)            | resistencia a gripe de Mixovirus 1                                        |
| BG283489 (PRKR)            | FLJ38348                                                                  |
| NM_001002264 (EPSTI1)      | Posible proteína de interacción estromal epitelial de mama                |
| NM_005101 (G1P2)           | Proteína estimulada por interferón (15 kDa)                               |
| NM_014314 (DDX58)          | AF038963                                                                  |
| NM_021105 (PLSCR1)         | Fosfolípido escramblasa P37                                               |
| NM_006417 (IFI44)          | agg microtubular asociado a hepatitis C inducida por Interferón           |
| NM_016410 (SNF7DC2)        | proteína modificadora de cromatina 5                                      |
| NM_012420 (IFIT5)          | proteína inducible por ácido retinoico e interferón (58kD)                |
| NM_006820 (IFI44L)         | marco de lectura abierto 29 de cromosoma 1                                |
| NM_006187 (OAS3)           | 2'-5'-oligoadenilato sintetasa 3                                          |
| NM_004509(SP110)           | Coactivador transcripcional Sp110                                         |
| NM_152703 (C7orf6)         | de tipo dominio de motivo alfa estéril que contiene 9                     |
| NM_005531 (IFI16)          | clon MGC:23885 IMAGE:4703266, ARNm, cds completos                         |
| NM_001001887 (IF1T1)       | Proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptidos 1 |
| NM_017523                  | Factor 1 asociado a XIAP, variante de transcrito 1                        |
| NM_001032731               | 2'-5'-oligoadenilato sintetasa 2, 69/711:Da                               |
| NM_017414                  | proteasa específica de ubiquitina 18                                      |
| NM_003733                  | tipo de 2'-5'-oligoadenilato sintetasa                                    |
| NM_001032409               | 2',5'-oligoadenilato sintetasa 1, 40/46kDa                                |
| NM_017554                  | familia de polimerasa poli (ADP-ribosa), miembro 14                       |
| NM_017742                  | dedo de zinc, dominio CCHC que contiene 2                                 |
| NM_002346                  | complejo de antígeno de linfocito 6, locus E                              |
| NM_005533                  | proteína inducida por interferón 35                                       |
| NM_015535                  | proteína 6 transactivada de D polimerasa                                  |
| NM_001013000               | sominio hect y RLD 6                                                      |
| NM_022750                  | familia de polimerasa poli (ADP-ribosa), miembro 12                       |
| NM_001547                  | proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptidos 2 |
| NM_022147                  | proteína transmembrana 7                                                  |
| NM_030776                  | Proteína de unión Z-D 1                                                   |
| NM_033109                  | poliribonucleótido nucleotidiltransferasa 1                               |
| NM_022168                  | interferón inducido con dominio 1 de helicasa C                           |

|           |                                                                     |
|-----------|---------------------------------------------------------------------|
| NM_014506 | familia de torsina 1, miembro B (torsina B)                         |
| NM_033405 | complejo 285 del receptor A activado por proliferador peroxisomal   |
| NM_017631 | proteína hipotética FLJ20035                                        |
| NM_017654 | dominio del motivo alfa estéril que contiene 9                      |
| NM_000577 | antagonista del receptor de interleuquina 1                         |
| NM_003810 | superfamilia (ligando) de factor de necrosis tumoral, miembro 10    |
| NM_000062 | inhibidor de serina (o cisteína) proteinasa, clado G, miembro 1     |
| NM_006573 | superfamilia (ligando) de factor de necrosis tumoral, miembro 13b   |
| NM_002463 | resistencia a mixovirus 2                                           |
| NM_003113 | proteína 1 de grupo de movilidad elevada 1-tipo 3                   |
| NM_138456 | factor de transcripción de cremallera básica de leucina, tipo ATF 2 |
| NM_023068 | sialoadhesina                                                       |
| NM_001295 | receptor 1 de quimioquina (motivo C-C)                              |
| NM_002053 | proteína de unión a guanilato 1, inducible por interferón, 67kDa    |

Tabla 7(i) Subgrupo de sgrupos de sondas de la Tabla 3.

|             |
|-------------|
| 214453_s_at |
| 204972_at   |

5

Tabla 7(ii) Subgrupo de grupos de sondas de la Tabla 3.

|             |
|-------------|
| 213797_at   |
| 226702_at   |
| 214453_s_at |
| 227609_at   |
| 242625_at   |
| 230036_at   |
| 214059_at   |
| 218400_at   |
| 204972_at   |

10

15

Tabla 7(iii) Subgrupo de grupos de sondas de la Tabla 3.

|             |
|-------------|
| 213797_at   |
| 226702_at   |
| 214453_s_at |
| 227609_at   |
| 242625_at   |
| 230036_at   |
| 214059_at   |
| 218400_at   |
| 226603_at   |
| 219863_at   |
| 204439_at   |
| 228617_at   |
| 203596_s_at |
| 204972_at   |
| 205483_s_at |
| 219211_at   |
| 223220_s_at |
| 205660_at   |
| 204747_at   |
| 218943_s_at |
| 203153_at   |
| 205552_s_at |
| 224701_at   |
| 208436_s_at |

20

# REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico en un sujeto, comprendiendo dicho método determinar si el sujeto comprende una célula que expresa SAMD9L y por lo menos otro gen (o gen asociado con un grupo de sondas) listado en las tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 a un nivel superior que el nivel de expresión de los genes respectivos en una muestra de referencia normal, en el que la detección de dicha célula indica que el sujeto tiene lupus eritematoso sistémico.
- 10 2. Método de predicción de la sensibilidad de un sujeto a terapia de lupus eritematoso sistémico, comprendiendo dicho método determinar si el sujeto comprende una célula que expresa SAMD9L y por lo menos otro gen (o gen asociado con un grupo de sondas) listado en las tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 a un nivel superior que el nivel de expresión de los genes respectivos en una muestra de referencia normal, en el que la presencia de dicha célula indica que el sujeto sería sensible a terapia contra lupus eritematoso sistémico.
- 15 3. Método para evaluar la predisposición de un sujeto para desarrollar lupus eritematoso sistémico, comprendiendo dicho método determinar si el sujeto comprende una célula que expresa SAMD9L y por lo menos otro gen (o gen asociado con un grupo de sondas) listado en las tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 a un nivel superior que el nivel de expresión de los genes respectivos en una muestra de referencia normal, en el que la detección de dicha célula indica una predisposición del sujeto para desarrollar lupus eritematoso sistémico.
- 20 4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, que comprende la utilización de una matriz/chip de genes/grupo de genes que comprenden polinucleótidos capaz de hibridarse específicamente a SAMD9L y por lo menos otro gen (o gen asociado con un grupo de sondas) listado en las tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7, en el que la matriz/chip de genes/grupo de genes es útil para detectar el lupus eritematoso sistémico en un sujeto.
- 25 5. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho método comprende determinar si el sujeto comprende una célula que expresa por lo menos 3 de los genes (o genes asociados con grupos de sondas) listados en las tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7.

Figura 1

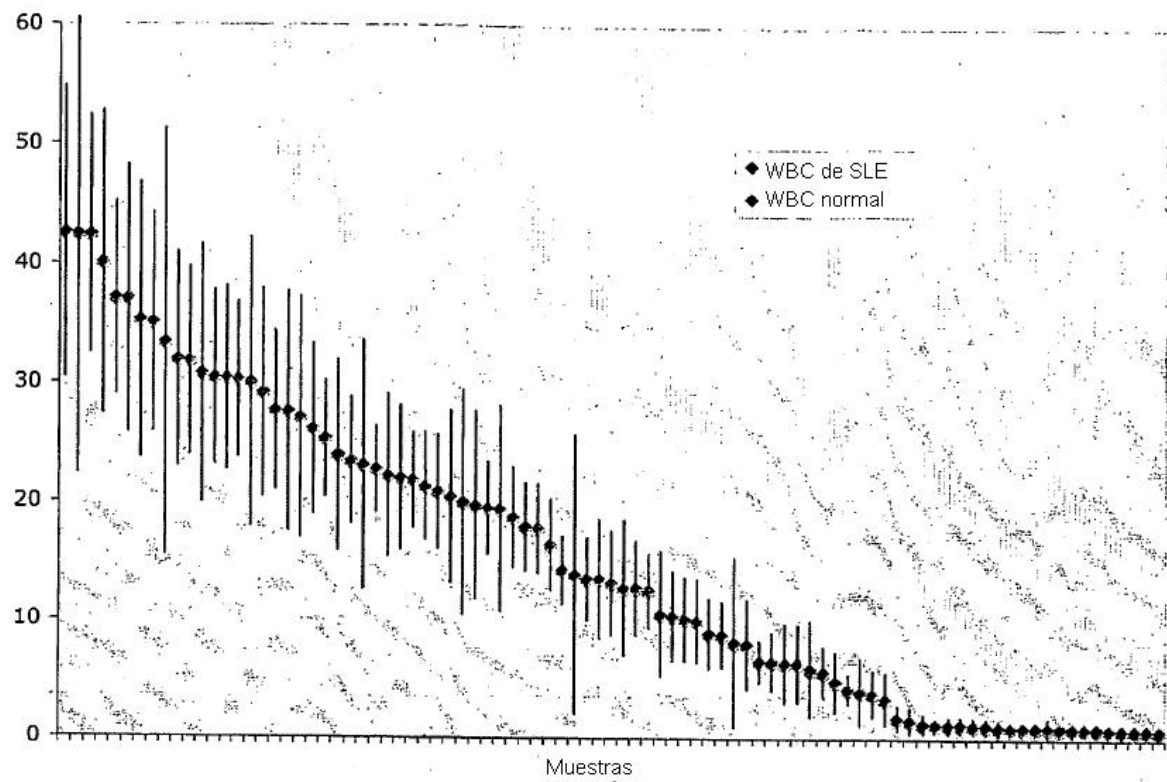


Figura 2

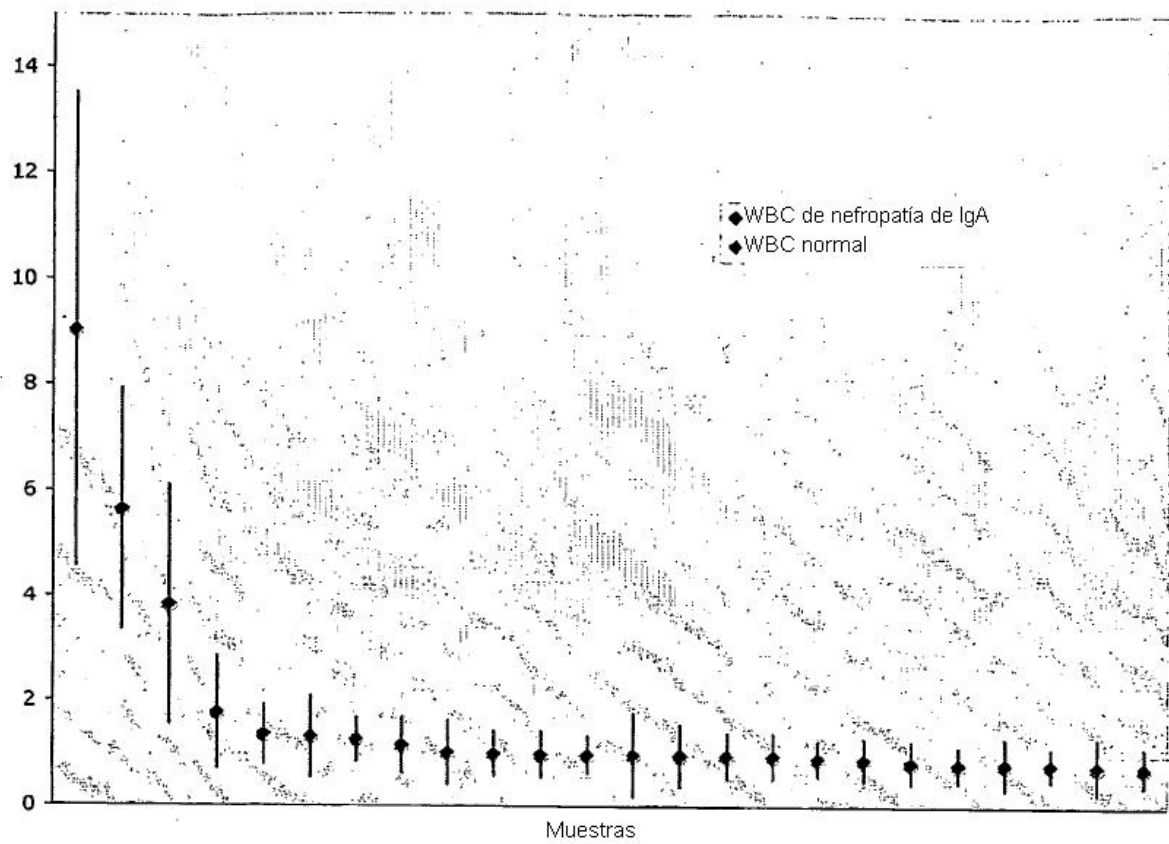


Figura 3

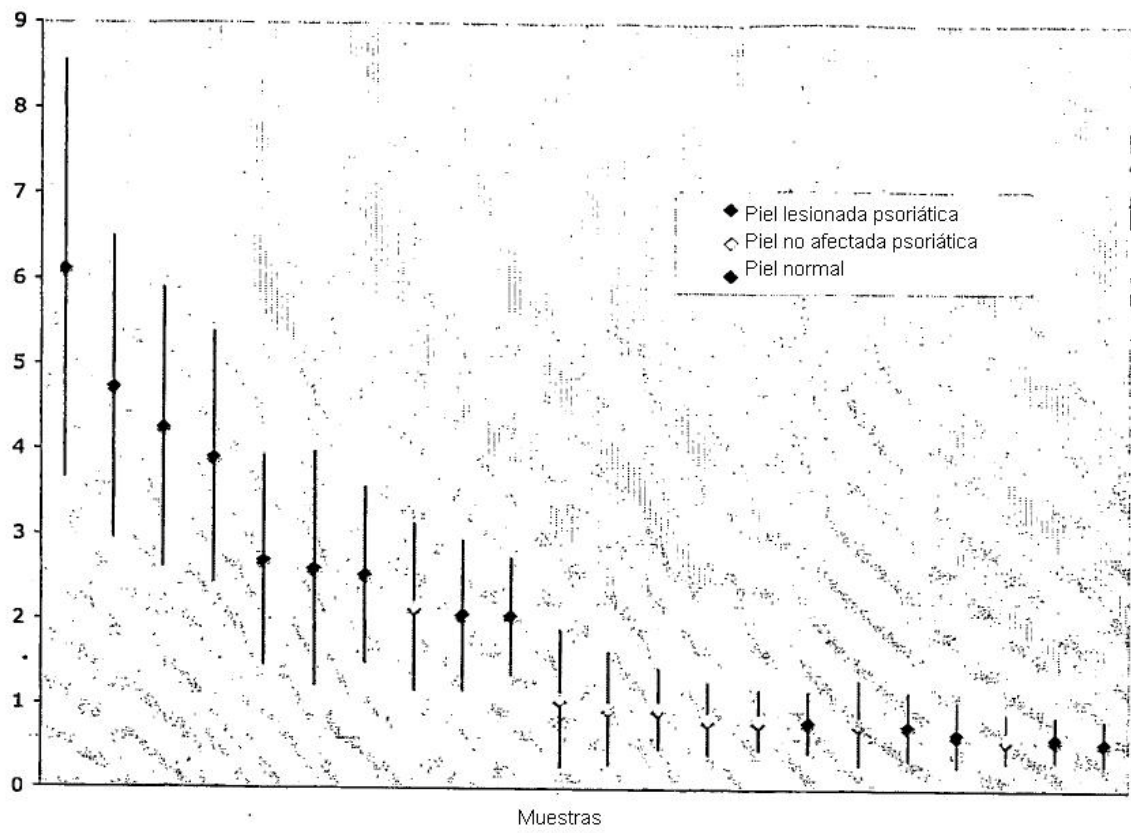


Figura 4

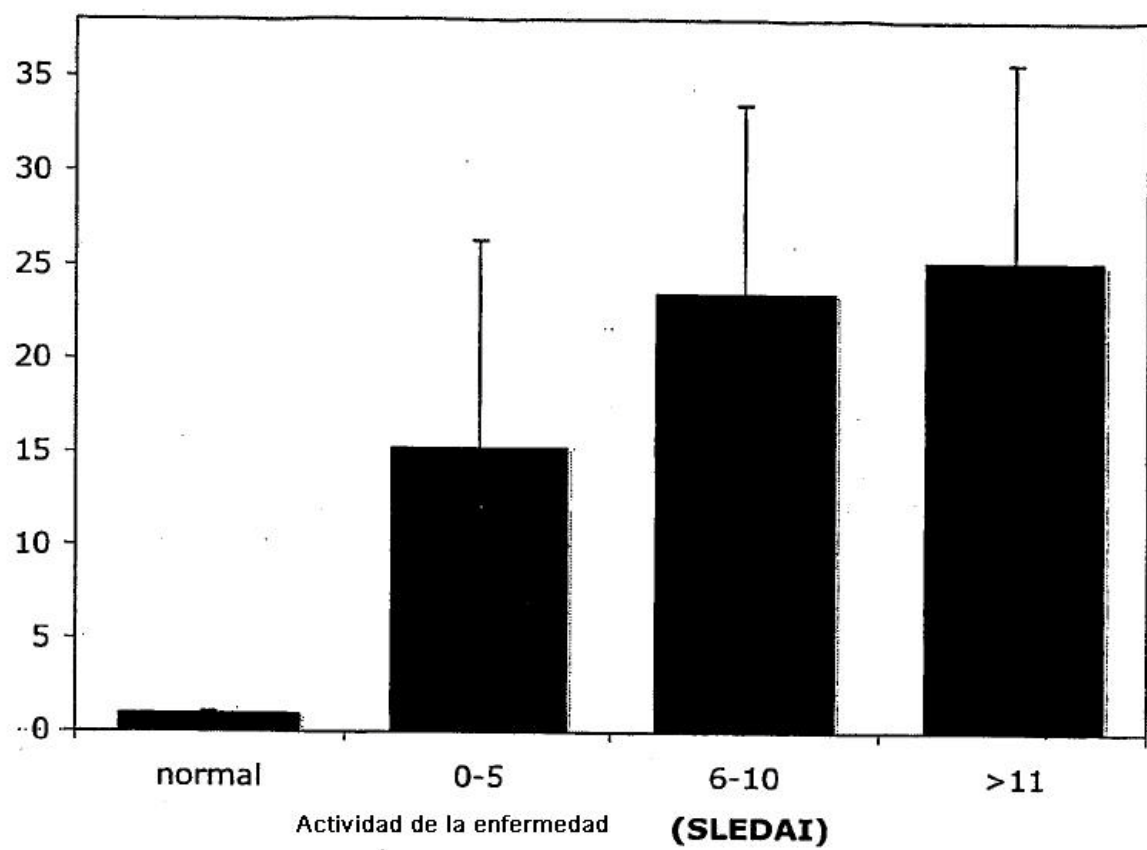


Figura 5

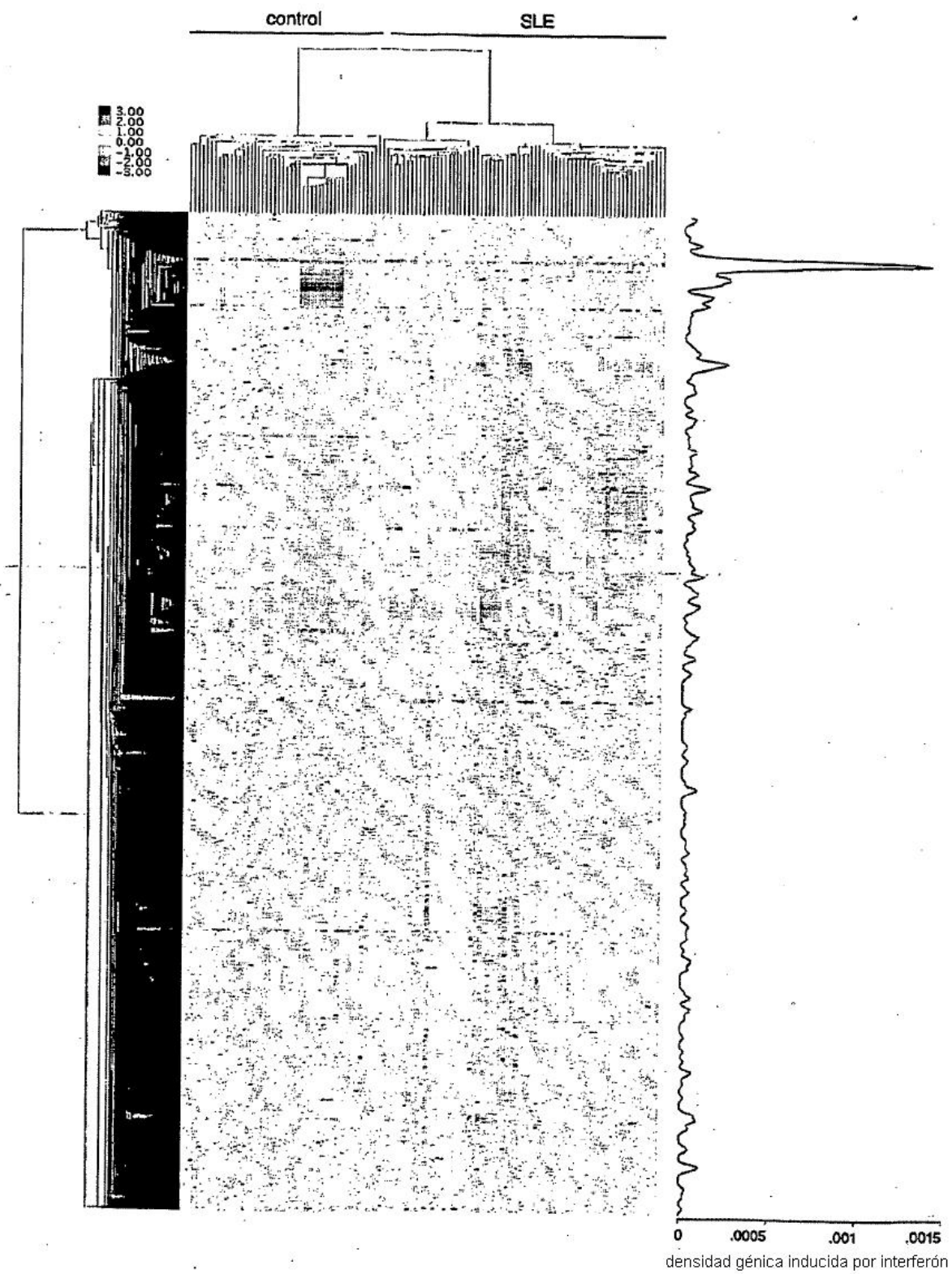


Figura 6

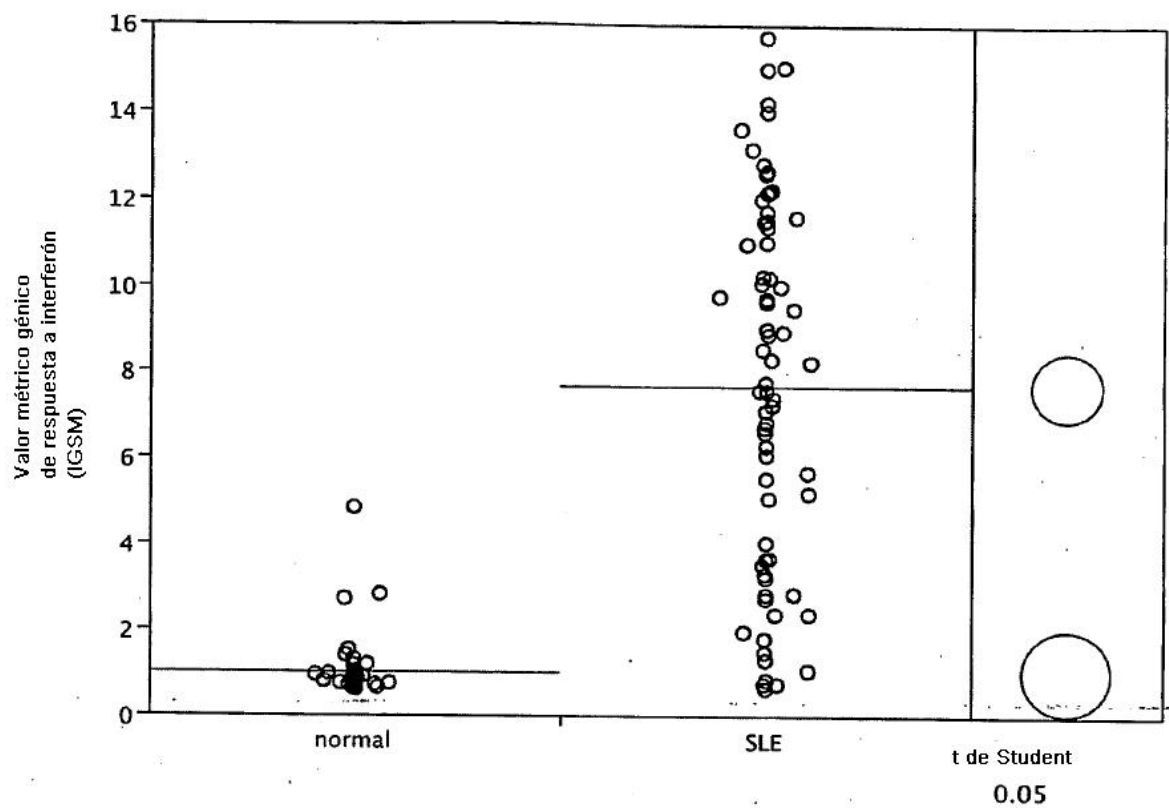


Figura 7

