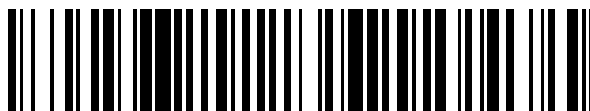


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 676**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2007** **E 07818943 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012** **EP 2074230**

54 Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento y el diagnóstico de síndrome de intestino irritable**

30 Prioridad:

11.10.2006 US 850659 P

14.11.2006 EP 06023597

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

11.04.2013

73 Titular/es:

JANSSEN PHARMACEUTICA NV (50.0%)

TURNHOUTSEWEG 30

2340 BEERSE, BE y

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (50.0%)**

72 Inventor/es:

THIELEMANS, THEODOOR VICTOR CONSTANT;

AERSSSENS, JEROEN MARCEL MARIA ROGER;

TALLOEN, WILLEM JAN-PAUL EDMOND;

THIELEMANS, LEEN ALBERT LEONARDA y

CAMILLERI, MICHAEL L.

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 400 676 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para el tratamiento y el diagnóstico de síndrome de intestino irritable

La presente invención se refiere en general al diagnóstico de desórdenes asociados a hipersensibilidad visceral crónica (CVH), y en particular a síndrome de intestino irritable (IBS). En particular, esta invención se refiere a polinucleótidos que codifican polipéptidos, en los que se muestra que dichos polipéptidos están asociados a CVH. Estos polipéptidos y polinucleótidos son útiles en el diagnóstico, tratamiento y/o prevención de desórdenes asociados a CVH, en particular en el diagnóstico, tratamiento y/o prevención de desórdenes asociados a IBS.

Antecedentes de la invención

El síndrome de intestino irritable (IBS) y la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), representan dos condiciones caracterizadas por síntomas crónicamente recurrentes de dolor abdominal, molestias (urgencia e hinchazón) y alteraciones en los hábitos intestinales. Sin embargo, estas enfermedades intestinales difieren significativamente en cuanto a etiología y fisiopatología, implicando con ello diferentes métodos de diagnóstico y tratamiento. Cuando la IBD está caracterizada por inflamación o ulceraciones en el intestino delgado y/o grueso, tales cambios estructurales hostiles no han sido asociados a IBS. El IBS está clasificado como un desorden intestinal funcional (en oposición a orgánico) de etiología desconocida. Un desorden funcional se refiere a un desorden o una enfermedad en la que la anomalía principal es una función fisiológica alterada, en vez de ser una causa estructural o bioquímica identificable. El diagnóstico de IBS se basa normalmente en una agrupación característica de síntomas en ausencia de anomalías estructurales detectables (Drossman DA, Camilleri M, Mayer EA, Whitehead WE. Revista técnica AGA sobre síndrome de intestino irritable. Gastroenterología. 2002; 123: 2108-31), que incluyen el dolor abdominal intermitente y molestias y alteraciones en los hábitos del intestino, tal como movimientos intestinales flojos o con más frecuencia, diarrea, y/o constipación que ocurren en ausencia de enfermedad orgánica detectable en curso. Debido a la falta de especificidad de los síntomas esenciales de dolor abdominal o molestia abdominal, la diagnosis habitual de IBS se aplica a un grupo heterogéneo de pacientes, incluso después de intentos para definir subgrupos basados en hábito intestinal predominante (diarrea predominante, constipación predominante, diarrea y constipación alternos, normal). El IBS afecta a aproximadamente el 10-20% de la población general. Es la enfermedad más común diagnosticada por gastroenterólogos y uno de los desórdenes más comunes vista por médicos de atención primaria.

Las teorías habituales para explicar la patofisiología del IBS incluyen alteraciones en la percepción visceral, movilidad gastrointestinal o del epitelio intestinal y función inmune. Las evidencias publicadas demuestran que el IBS está asociado a un estado de hipersensibilidad visceral crónica (CVH) que sugiere que el procesamiento de la información sensorial visceral se altera, pero los cambios moleculares que subyacen en el desarrollo y mantenimiento de CVH en el IBS, no son conocidos. Las evidencias publicadas soportan un papel de agentes agresivos sicosociales y físicos (por ejemplo, infecciones entéricas) como los activadores central y periférico, respectivamente, que pueden inducir la presentación o la exacerbación de síntomas de IBS. Existe, por ejemplo, una evidencia creciente de un papel putativo de inflamación crónica de nivel bajo en la patogénesis de IBS. Como consecuencia, los tratamientos médicos actuales para IBS tienen principalmente como objetivo los síntomas periféricos en vez de las causas subyacentes, y los beneficios terapéuticos del tratamiento con medicamentos son normalmente modestos y las respuestas de placebo son altas (Mertz H, Naliboff B, Munakata J, Niazi N, Mayer EA. La percepción rectal alterada es un marcador biológico de pacientes con síndrome de intestino irritable. Gastroenterología. 1995; 109: 40-52). Definir los defectos neurológicos y moleculares subyacentes es por tanto importante para el diseño de estrategias terapéuticas de mayor éxito. Además, existe una necesidad en el estado de la técnica de métodos mejorados para depurar, diagnosticar y tratar IBS y otros desórdenes relacionados con CVH.

En un primer esfuerzo por tratar e identificar los defectos moleculares subyacentes, Pasricha P et al. (Publicación PCT WO 2005/020902) informa del análisis de perfiles de expresión de micro-matriz de ARN de tejido de colon y de ARN de ganglios de raíz dorsal a partir de un modelo de rata de hipersensibilidad visceral crónica tras el tratamiento con CNI-1493.

Park et al. (2005), Gastroent. Clin. 34, 305-317 divulga las implicaciones genéticas en el diagnóstico y tratamiento de síndrome de intestino irritable (IBS) y revisa unos pocos polimorfismos específicos enlazados a IBS y divulga niveles de mRNA bajos de SERT y de triptófano hidroxilasa en biopsias de mucosa de pacientes con IBS. Este artículo divulga además que el IBS tiene la dificultad de ser una enfermedad multifactorial con muchos factores que tienen influencia en, y que potencialmente provocan, la enfermedad. Coates et al. (2004) Gastroenterol. 126, 1657-1664, divulga el establecimiento de genes marcadores para detectar IBS. Olsen et al. (2004) Gastroenterología 126 S2, A335, divulga el análisis de expresión de genes en muestras procedentes de pacientes de IBS, que se utilizan como control y menciona datos procedentes de otros experimentos de expresión en mucosa de colon inflamada. Aersens et al. (2006), Servicio de información de Biociencias, divulga estudios basados en matriz en un modelo de IBS de ratón. Matrices tales como las "Affymetric Genechip Human Genome U133 plus 2.0 Array" se encuentran disponibles comercialmente.

Sumario de la invención

En la presente memoria se informa sobre el análisis de perfiles de expresión de micro-matriz de biopsias de mucosa sigmoidea de colon procedente de pacientes de IBS y de sujetos de control sanos. Este análisis reveló un número de genes expresados diferentemente en pacientes de IBS que apuntan a alteraciones funcionales de componentes específicos del sistema de defensa del anfitrión y de la respuesta inmune. Estos constituyen el soporte de un papel importante para cambios gastrointestinales periféricos que subyacen en la etiología de IBS. Dos conjuntos de sondas genéticas con la expresión más impresionantemente incrementada en biopsias de mucosa de colon de pacientes de IBS, representan un gen que está, hasta el momento, sin caracterizar (DKFZP564O0823) [SEQ ID NO. 15]. Se propone renombrar este gen como IBS1. IBS1 es mencionado con SEQ ID NO. 15 a través de la descripción, y se hace referencia al gen con SEQ ID NO: 15 o a la proteína codificada por SEQ ID NO. 15. Se describe la identificación de conjuntos específicos de sondas genéticas en la micro-matriz, lo que se denominan firmas moleculares que permiten la distinción de pacientes de IBS respecto a sujetos de control sanos. Los perfiles de expresión en IBS son uniformes a través de las diferentes posiciones dentro del colon, y son estables con el tiempo. Por lo tanto, las firmas moleculares identificadas proporcionan la oportunidad de desarrollar biomarcadores que se pueden usar en el diagnóstico y la evaluación de la respuesta a la terapia en (subconjuntos de) pacientes de IBS. Esto representa un avance significativo en base a cambios específicos en actividades biológicas en vez del estándar habitual, que depende exclusivamente del cambio en los síntomas clínicos únicamente.

La presente invención está basada en el hallazgo sorprendente de que, a pesar de la ausencia de anomalías estructurales en el colon de pacientes de IBS, no sólo es posible identificar genes expresados diferencialmente en comparación con tejido normal sino que los genes de los que su expresión diferencial se asocia a IBS tienen un valor diagnóstico, predictivo y/o terapéutico.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a la identificación de un número de genes que hasta ahora no habían sido asociados con IBS, mencionados en lo que sigue como genes de firma molecular de IBS (IBS-MSFs) (Tabla 1), y por consiguiente proporciona moléculas de ácido nucleico en métodos de diagnóstico para identificar un IBS en un sujeto.

Las moléculas de ácido nucleico pueden ser usadas individualmente, por ejemplo para monitorizar el nivel de expresión de un gen individual, o pueden ser proporcionadas en formato de micro-matriz, para identificar y/o monitorizar IBS en un sujeto. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser usadas para diseñar oligonucleótidos antisentido y ARN de interferencia corta (siRNA), ribozimas y otras moléculas útiles para modificar expresión de gen, a efectos de diagnóstico, depuración y terapéutica. Además, las moléculas de ácido nucleico pueden ser usadas para expresar las proteínas codificadas. Un experto en la materia puede diseñar también antígenos de péptido basados en secuencias de ácido nucleico.

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos, más en particular métodos *in vitro*, para el diagnóstico de una CVH y en particular de un IBS, comparando los niveles de expresión de uno o más IBS-MSGs a nivel de nucleótido de muestras biológicas procedentes de un sujeto con muestras de control.

Los métodos se divulgan para detección y/o monitorización de IBS en un sujeto, cuyos métodos comprenden las etapas de (a) determinar, en una muestra biológica de dicho sujeto, el nivel de transcripción genética de un IBS-MSG según se reivindica; (b) comparar el nivel de transcripción genética con el nivel de transcripción genética en una muestra de control normal; y (c) producir un diagnóstico en base al resultado de la etapa (b). Más en particular, los métodos incluyen determinar si existe una diferencia en la expresión de esos genes en comparación con la expresión de esos genes de una muestra de control, con lo que una diferencia en la expresión de uno o más de esos genes es indicativa de IBS, del estado de IBS y/o de la susceptibilidad a un tipo de tratamiento específico.

Los métodos de la presente invención incluyen determinar el incremento y/o la disminución de expresión de genes particulares. Estos métodos incluyen determinar si existe un incremento correspondiente a al menos un cambio de 1,15, más preferentemente 1,2 veces, o si existe una reducción correspondiente a un cambio de al menos 0,85 veces, más en particular al menos un cambio de 0,8 veces, en la expresión del gen comparativamente con los controles.

En la etapa (a) de los métodos de la invención, el nivel de transcripción genética se determina a nivel de transcripción de gen, con preferencia usando sondas que se enlazan específicamente a un oligonucleótido transcrito a partir de dicho IBS-MSG, con preferencia a nivel de cADN o de mRNA. El nivel de transcripción de gen se determina opcionalmente usando tecnología de matriz, o bien a nivel de oligonucleótido usando sondas específicas según se describe en la presente memoria.

En realizaciones específicas de la invención, el nivel de transcripción genética se evalúa usando una matriz de sondas de oligonucleótido que se enlazan a los IBS-MSGs.

Típicamente, el nivel de transcripción de gen se evalúa usando reacción de cadena de polimerasa cuantitativa de transcripción reversa (RTQ-PCR).

Las muestras biológicas que se utilizan en los métodos de la presente invención son sangre (incluyendo sangre completa, suero, plasma y en particular glóbulos blancos de la sangre), orina, saliva, muestra fecal, células fecales,

biopsia de tejidos (en particular biopsia de colon) o material de autopsia.

En métodos de la invención, el nivel de expresión de gen se determina usando una matriz de sondas de oligonucleótido que se enlazan a IBS-MSGs según se reivindica.

Otro aspecto más de la presente invención proporciona kits para diagnosticar CVH, en particular IBS, cuyos kits comprenden sondas de polinucleótido que se enlazan específicamente a un IBS-MSG.

Las características anteriores y otras características, los detalles y ventajas de la presente invención, resultarán evidentes a partir de la descripción detallada que sigue, tomada junto con los dibujos que se acompañan, los cuales ilustran, a título de ejemplo, los principios de la invención. Los números de referencia identificados en lo que sigue, se refieren a los dibujos anexos.

10 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Análisis de correlación de concordancia de los perfiles de expresión de muestras sigmoideas de colon recogidas a partir de 10 individuos.

El grado de similitud (coeficiente de correlación de concordancia, CCC) de las muestras se indica mediante códigos de colores. El análisis incluía tres muestras por cada sujeto: muestras A y B tomadas al mismo tiempo, localizadas a aproximadamente 10 cm de distancia en el colon cada una de la otra, y muestra C recogida 85 días más tarde. Los cuadrados azules indican el análisis de correlación de concordancia para muestras procedentes de un individuo. Una línea negra gruesa distingue las muestras de IBS y de sujetos sanos. El análisis fue realizado sobre (A) un conjunto de 1.000 sondas genéticas que mostraron la variación de expresión más grande dentro del conjunto de datos completo, y (B) un conjunto de 32 sondas genéticas identificadas en el análisis de predicción para micro-matrices.

Figura 2: Diagramas que representan los resultados de un análisis de mapa espectral sobre los datos de micro-matriz procedentes de muestras sigmoideas de colon de pacientes de IBS y de sujetos sanos. Los diferentes gráficos muestran diferentes combinaciones de seis primeros componentes principales (PC) del análisis. Los círculos rojos representan muestras procedentes de sujetos que se prestaron voluntarios para una muestra de mucosa repetitiva; los círculos azules representan otros sujetos (no muestra repetitiva). Los sujetos que proporcionaron una muestra de repetición no fueron agrupados en ninguno de estos gráficos, sugiriendo que los mismos eran de hecho representativos del grupo en su totalidad.

Figura 3: Visión general esquemática de genes expresados diferencialmente en mucosa de colon de pacientes de IBS.

Genes con expresión incrementada (subrayados) o disminuida en las muestras de mucosa de colon procedentes de pacientes de IBS frente a controles sanos. Los complejos de proteína responsables de un aumento oxidativo brusco ($2O_2 \rightarrow 2O^-$) han sido mostrados en forma de pentágonos. "ROS" representa Especies de Oxígeno Reactivo.

Figura 4: Niveles de expresión relativa de genes significativos identificados mediante Significación de Análisis de Micro-matriz (SAM) en muestras de mucosa de colon procedentes de pacientes de IBS (puntos verdes) en comparación con controles sanos (puntos rojos). Los niveles de expresión (eje Y) están expresados como intensidad de señal fluorescente medida sobre la matriz tras el pre-procesamiento de los datos en bruto (véase Métodos). Cada punto individual representa el valor de expresión media de dos muestras por sujeto.

Figura 5: Perfil de expresión de gen DKFZP564O0823 [SEQ ID NO. 15] y análisis comparativo de secuencia. (A) Perfiles de expresión genética de dos conjuntos de sonda diferentes (204678_at y 225809_at) de la matriz Affimetrix que representan DKFZP564P0823 [SEQ ID NO. 15] (IBS1) en biopsias de mucosa de colon procedentes de pacientes de IBS (verde, a la derecha de las figuras) y de sujetos sanos (rojo, a la izquierda de las figuras). Cada círculo representa el promedio de dos muestras procedentes de un individuo. Los niveles de expresión están expresados como intensidad de señal medida sobre la matriz tras el re-procesamiento de los datos en bruto (véase Métodos). Las líneas horizontales verdes y rojas representan niveles de expresión media en sujetos sanos y de IBS, respectivamente. (B) Esta Figura muestra la excelente correlación entre los dos conjuntos de sondas que representan el gen IBS 1 [SEQ ID NO. 15]. Los controles sanos y los pacientes de IBS han sido indicados como cuadrados blancos y círculos negros, respectivamente (véase también la Figura 7). (C) Análisis comparativo de secuencia de proteína de ser humano (Hs) DKFZP564O0823 [SEQ ID NO. 15] (IBS1) (Hs_NP_056208) y sus homólogos de ratón (Mm-NP-663537) y de rata (Rn_NP_775137). Los aminoácidos idénticos sobre diferentes especies han sido resaltados con un fondo negro o gris. Diferentes dominios de la proteína han sido indicados bajo la secuencia de aminoácido.

Figura 6: (A) Examen de expresión de gen DKFZP564O0823 inducida por citoquinas inflamatorias de interferón gamma (IFN γ), factor alfa de necrosis tumoral (TNF α) e interleuquina 4 (IL4) sobre células endoteliales primarias de colon. De: Gene Expression Omnibus, Accesion núm. GDS502 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/gds/profileGraph.cgi?&dataset=S40\\$gmin=0.903309&gmax=-0.032624&gds=502&idref=5543&annot=DKFZP564O0823](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/gds/profileGraph.cgi?&dataset=S40$gmin=0.903309&gmax=-0.032624&gds=502&idref=5543&annot=DKFZP564O0823)).

(B) Análisis de Jurkat CD4+ células T a continuación de inducción de virus de inmunodeficiencia de simio (SIV) Nef procedente de un promotor inducible. La proteína Nef es expresada muy pronto en infecciones de HIV y de SIV y juega un papel crucial en la progresión de la enfermedad. Los resultados identifican cambios mediados por Nef en la expresión genética de células T. De: Gene Expression Omnibus, Accesion núm. GDS2164 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/gds/profileGraph.cgi?&dataset=ABPyqz&dataset=LL6g\\$gmin=2.600000&gmax=56.900000&gds=2164&id-ref=225809at&annot=DKFZP564O0823](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/gds/profileGraph.cgi?&dataset=ABPyqz&dataset=LL6g$gmin=2.600000&gmax=56.900000&gds=2164&id-ref=225809at&annot=DKFZP564O0823)).

Figura 7: Correlación de los niveles de expresión de dos conjuntos de sonda, 204687_at y 225809_at, que representan el gen DKFZP564O0823. Los controles sanos y los pacientes de IBS han sido indicados como cuadrados negros (agrupados por medio de una línea de puntos) y círculos negros (agrupados por medio de una línea de trazos discontinuos), respectivamente.

Figura 8: Resumen de Análisis Predictivo de Micro-matrices (PAM): salida procedente del clasificador de centroide contraído más cercano sobre el estado de enfermedad de IBS.

(A) Curva de error de clasificación validada cruzada que muestra que el error de clasificación más bajo se obtiene cuando se usan 32 genes. Se seleccionó el delta (2.0) correspondiente como umbral para otros análisis. Los centroides de clase contraída por cada clase para los 32 genes que sobrevivieron al umbral (delta = 2.0). Para más detalles, véase Tibshirani et al. (2002).

Figura 9: (A) Presentación agrupada de mapa térmico con agrupación jerárquica de 16 conjuntos de sonda y muestras que utilizaron el valor medio de enlace y correlación como medición de similitud. Los colores del mapa térmico representan el nivel de expresión relativa sobre una escala de gradiente de color comprendida en el intervalo del azul (expresión alta) a negro (expresión intermedia) a amarillo (expresión baja). Esta escala de color está optimizada para cada conjunto de sonda individual respecto a todas las muestras (es decir, la muestra con el nivel de expresión más alto es azul, y la muestra con el nivel de expresión más bajo es amarilla). La línea horizontal blanca del mapa térmico discrimina el estado de enfermedad según ha sido pronosticado por medio de la signatura molecular obtenida para IBS. El panel derecho de la figura muestra el estado de enfermedad clínicamente diagnosticada en los sujetos asignados al adiestramiento o al conjunto de prueba.

(B) El panel derecho de la Figura 9A ha sido mostrado de nuevo, en este caso enlazado también al género de los sujetos y al tratamiento con medicamento concomitante. (M: macho; F: hembra; SSRI: inhibidor selectivo de reabsorción de serotonina; SNRI: inhibidor de reabsorción de serotonina-norepinefrina; SNDRI: inhibidor de reabsorción de serotonina-norepinefrina-dopamina; TCA: antidepresivo tricíclico).

Figura 10: Comparación del número de veces de cambios en el nivel de expresión de mRNA, según se mide mediante micro-matriz y RTQ-PCR, entre pacientes de IBS y sujetos sanos. Los genes significativos del estudio de micro-matriz que fueron confirmados como estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en análisis de RTQ-PCR han sido subrayados.

Descripción detallada

Las realizaciones preferidas de la invención van a ser descritas en lo que sigue. A menos que se indique específicamente, se pretende que las palabras y frases usadas en la descripción y reivindicaciones se proporcionan con su significado ordinario y habitual para los expertos en la materia de la técnica aplicable. Si se pretende el uso con otro significado, la descripción indicará específicamente que se está aplicando un significado especial a una palabra o una frase.

También se pretende que las invenciones no estén limitadas únicamente por la estructura, material o acciones específicas que se describen en las presentes realizaciones, sino que además, incluyan cualquiera y todas las estructuras, materiales o acciones que realicen la función reivindicada, junto con cualquiera y con todas las estructuras, materiales o acciones equivalentes que se desarrollen con posterioridad para llevar a cabo la invención reivindicada.

Existen ejemplos adicionales a través de la descripción, y no es intención de la solicitante excluir el uso de estructuras, materiales, métodos o acciones que no sean identificados expresamente en la descripción, pero que no obstante sean capaces de llevar a cabo la función reivindicada.

Según se utiliza en la presente memoria, el término “compuesto” o “agente” significa un compuesto biológico o químico tal como una molécula orgánica simple o compleja, una proteína o un oligonucleótido. Un “compuesto de prueba” según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un “compuesto” o “agente” utilizado para evaluar si dichos compuestos enlazan con y/o modulan una actividad de un producto de IBS-MSG.

El término “hipersensibilidad visceral crónica – genes de señal molecular” o “CVH-MSG” según se utiliza en la presente memoria, se refiere a genes cuya expresión está asociada al diagnóstico clínico de hipersensibilidad visceral crónica (CVH). Esto incluye genes que están específicamente sobre-regulados o sub-regulados en pacientes diagnosticados con CVH en comparación con pacientes de control sanos.

El término “genes de signatura molecular de síndrome de intestino inflamatorio” o “IBS-MSG” según se utiliza en la presente memoria se refiere a genes cuya expresión está asociada al diagnóstico clínico de síndrome de intestino inflamatorio (IBS). Esto incluye genes que están específicamente sobre-regulados o sub-regulados en pacientes diagnosticados con IBS en comparación con pacientes de control sanos.

El término “producto de IBS-MSG” o “producto de gen” según se utiliza en la presente memoria incluye un polinucleótido o un polipéptido y variantes de los mismos, generados cuando se transcribe y/o se traduce un IBS-MSG.

Según se utiliza en la presente memoria, una “variante de un nucleótido” incluye un polinucleótido que difiere del polinucleótido original en una o más sustituciones, adiciones, borrados y/o inserciones, de tal modo que la actividad del polipéptido codificado no cambia sustancialmente (por ejemplo, la actividad puede ser incrementada o disminuida, en menos de un 50%, y con preferencia, en menos de un 20%) en relación con el polipéptido codificado por el polinucleótido original.

Una variante de un polinucleótido incluye también polinucleótidos que son susceptibles de hibridación bajo condiciones de rigurosidad reducida, más preferentemente condiciones rigurosas, y más preferentemente condiciones altamente rigurosas respecto al polinucleótido original (o una secuencia complementaria).

Los expertos en la materia podrán apreciar que, como resultado de la degeneración del código genético, existen muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido según se describe en la presente memoria. Algunos de estos polinucleótidos portan homología mínima con la secuencia de nucleótido de cualquier gen original. Sin embargo, el polinucleótido en el que las alteraciones están limitadas a cambios silentes, es decir cambios que no alteran los aminoácidos codificados por el polinucleótido, son contemplados específicamente por la presente invención.

Las variantes de polinucleótido presentan con preferencia al menos alrededor de un 70%, con preferencia al menos alrededor de un 80%, más preferentemente al menos alrededor de un 90%, incluso más preferentemente al menos un 95%, en particular al menos un 97% de homología de secuencia con el polinucleótido original.

El término “hibridación” según se utiliza en la presente memoria se refiere a un proceso en el que una molécula de ácido nucleico de cadena simple se une a una cadena complementaria a través de emparejamiento de base de nucleótido.

El término “rigurosidad” se refiere a condiciones de hibridación. Las condiciones de alta rigurosidad desfavorecen el emparejamiento de base no homóloga. Las condiciones de baja rigurosidad tienen el efecto opuesto. La rigurosidad puede ser alterada, por ejemplo, por la temperatura y la concentración de sal. “Condiciones de rigurosidad” se refieren a una incubación durante la noche a 42 °C en una solución que comprende un 50% de formamida, 5x SCC (750 nM NaCl, 75 nM citrato de sodio), 50 mM fosfato de sodio (pH 7,6), 5x solución de Denhardt, 10% sulfato de dextrano, y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado, desnaturalizado, seguido de un lavado de los filtros en 0,1 x SSC a alrededor de 55 °C. Otras condiciones de hibridación adecuadas se describen en los ejemplos.

“Condiciones de rigurosidad más baja” incluyen una incubación durante la noche a 37 °C en una solución que comprende 6x SSPE (20x SSPE = 3M NaCl; 0,2M NaH₂PO₄; 0,02M EDTA, pH 7,4), 0,5% SDS, 30% formamida, 100 µg/ml de ADN bloqueante de esperma de salmón; seguido de lavados a 50 °C con 1 X SSPE, 0,1% SDS. Adicionalmente, para conseguir incluso una rigurosidad más baja, los lavados realizados a continuación de la hibridación rigurosa pueden hacerse a concentraciones de sal más altas (por ejemplo, 5X SSC). Obsérvese que las variaciones en las condiciones anteriores pueden ser llevadas a cabo mediante la inclusión y/o la sustitución de reactivos de bloqueo alternativos usados para suprimir fondo en experimentos de hibridación. Los reactivos de bloque típicos incluyen reactivo de Denhardt, BLOTTO, heparina, ADN de esperma de salmón desnaturalizado, y formulaciones de uso interno comercialmente disponibles. La inclusión de reactivos de bloqueo específicos puede requerir la modificación de las condiciones de hibridación descritas con anterioridad, debido a problemas de incompatibilidad.

Los términos “complementario” o “complementariedad” según se utilizan en la presente memoria, se

refieren a la capacidad de los nucleótidos de purina y pirimidina para asociarse a través de enlace de hidrógeno para formar moléculas de ácido nucleico de doble cadena. Los pares de bases que siguen están relacionados por complementariedad: guanina y citosina; adenina y timina; y adenina y uracil. Según se utiliza en la presente memoria, el término “complementario” significa que la relación mencionada anteriormente se aplica a sustancialmente todos los pares de base que comprenden dos moléculas de ácido nucleico de cadena simple sobre la longitud total de dichas moléculas. “Parcialmente complementario” se refiere a la relación mencionada anteriormente en la que una de las dos moléculas de ácido nucleico de cadena simple es de longitud más corta que la otra de tal modo que una porción de una de las moléculas se mantiene como de cadena simple.

El término “sujeto” según se utiliza en la presente memoria se refiere a un mamífero (por ejemplo, un roedor tal como un ratón o una rata, un cerdo, un primate, o un animal de compañía (por ejemplo, un perro o un gato)). En particular, el término se refiere a humanos.

Los términos “matriz” y “micro-matriz” se utilizan de manera intercambiable y se refieren en general a cualquier disposición ordenada (por ejemplo, sobre una superficie o un sustrato) de moléculas diferentes, mencionadas en la presente memoria como “sondas”. Cada sonda diferente de una matriz está capacitada para reconocer específicamente a, y/o enlazarse con, una molécula particular, que se menciona en la presente memoria como su “objetivo”, en el contexto de las matrices. Ejemplos de moléculas objetivo típicas pueden ser detectados usando micro-matrices que incluyan transcripciones de mRNA, moléculas de cADN, moléculas de cARN, y proteínas.

Las micro-matrices son útiles para detectar la presencia, la ausencia y la cantidad, simultáneamente, de una pluralidad de moléculas objetivo diferentes en una muestra (tal como una preparación de mRNA aislada de una célula, tejido u organismo relevante, o una preparación de cADN o cARN correspondiente). La presencia y la cantidad, o la ausencia, de una molécula objetivo de la sonda en una muestra puede ser determinada fácilmente analizando si (y cuánto) un objetivo está enlazado a una sonda en una localización particular sobre la superficie o sustrato.

En una realización preferida, las matrices utilizadas en la presente invención son “matrices direccionables” en las que cada sonda diferente está asociada a una “dirección” particular. Por ejemplo, en una realización preferida en la que las sondas están inmovilizadas sobre una superficie o un sustrato, cada sonda diferente de la matriz direccionable está inmovilizada en una localización particular, conocida, sobre la superficie o sustrato. La presencia o la ausencia de esa molécula objetivo de la sonda en una muestra puede ser, por lo tanto, determinada fácilmente detectando si un objetivo se encuentra enlazado en esa posición particular de la superficie o el sustrato.

Las matrices conforme a la presente invención son matrices de ácido nucleico (también mencionadas en la presente memoria como “matrices de transcripción” o “matrices de hibridación”) que comprenden una pluralidad de sondas de ácido nucleico inmovilizadas sobre una superficie o un sustrato. Las diferentes sondas de ácido nucleico son complementarias con, y por lo tanto pueden hibridarse con, moléculas diferentes de ácido nucleico objetivo en una muestra. Así, tales sondas pueden ser usadas para detectar la presencia de, y cuantificar, simultáneamente, una pluralidad de moléculas diferentes de ácido nucleico en una muestra, para determinar el nivel de expresión de una pluralidad de genes diferentes, por ejemplo la presencia y la abundancia de moléculas de mRNA diferentes, o de moléculas de ácido nucleico derivadas del mismo (por ejemplo, cADN o cARN).

Existen dos tipos principales de tecnología de micro-matriz: matrices de cADN punteadas y matrices de oligonucleótido fabricadas. La sección de Ejemplos que sigue describe el uso de matrices Affymetrix GeneChip® de oligonucleótido de alta densidad. Las matrices son preferentemente reproducibles, permitiendo que se puedan reproducir múltiples copias de una matriz dada y los resultados de cada una comparados fácilmente con los de otras. Con preferencia, las micro-matrices son pequeñas, normalmente más pequeñas de 5 cm, y están realizadas a partir de materiales que son estables bajo condiciones de enlace (por ejemplo, hibridación de ácido nucleico). Un sitio de enlace dado o un conjunto de sitios de enlace de la micro-matriz enlazarán específicamente con el objetivo (por ejemplo, el mRNA de un gen simple de la célula). Aunque puede existir más de un sitio de enlace físico (en lo que sigue, “sitio”) por objetivo específico, por motivos de claridad se supondrá en la descripción que sigue que existe un sitio único. Se apreciará que cuando se prepara cADN complementario con el ARN de una célula y se hibridiza en una micro-matriz bajo condiciones de hibridación, el nivel o el grado de hibridación en el sitio de la matriz correspondiente a un gen particular reflejará la prevalencia en la célula de mRNA transcrito desde ese gen. Por ejemplo, cuando se etiqueta detectablemente (por ejemplo, con un fluoróforo) cADN complementario con el mRNA celular total que está hibridizado en una micro-matriz, cualquier sitio de la matriz correspondiente a un gen (es decir, capacitado para enlazar específicamente con un producto de ácido nucleico del gen) que no esté transcrito en la célula tendrá una pequeña o ninguna señal, mientras que un gen para el que el mRNA codificado sea altamente prevalente tendrá una señal relativamente fuerte.

A título de ejemplo, el análisis de expresión GeneChip® (Affymetrix, Santa Clara, CA) genera datos para la

evaluación de perfiles de expresión de gen y otros ensayos biológicos.

Las matrices de expresión de oligonucleótido "interrogan" de forma simultánea y cuantitativa miles de transcripciones de mRNA (genes o ESTs), simplificando grandes estudios genómicos. Cada transcripción puede estar representada en una matriz de sonda por múltiples pares de sondas para diferenciar entre miembros relativamente próximos de familias de genes. Cada conjunto de sonda contiene millones de copias de una sonda de oligonucleótido específica, permitiendo la detección precisa y sensible de incluso modelos de hibridización de mRNA de baja intensidad. Una vez que se han capturado datos de intensidad de hibridización, por ejemplo usando sistemas de detección óptica (por ejemplo, un escáner), se puede usar software para calcular automáticamente valores de intensidad para cada célula de sonda. Se pueden usar intensidades de célula de sonda para calcular una intensidad media para cada gen, que se correlacione con niveles de abundancia de mRNA. Los datos de expresión pueden ser clasificados rápidamente en base a cualquier parámetro de análisis, y mostrados en una diversidad de formatos gráficos para cualquier subconjunto de genes seleccionado. Las tecnologías de detección de expresión genética incluyen, entre otros, los productos de investigación fabricados y vendidos por Hewlett-Packard, Perkin-Elmer y Gene Logic.

El término "sustitución conservativa" o "sustitución conservativa de aminoácido", se refiere a la sustitución de uno o más residuo(s) de aminoácido en una proteína genitora sin afectar a la actividad biológica de la molécula genitora en base a la sustituibilidad reconocida en la técnica de ciertos aminoácidos (véase, por ejemplo, M. Dayhoff, en Atlas de Secuencia y Estructura de Proteína, Vol. 5, Sup. 3, pág. 345-352, 1978).

"Fragmentos de la misa" se refiere a un fragmento, lugar o sub-región de una molécula de ácido nucleico o de proteína cuya secuencia se describe en la presente memoria, de tal modo que el fragmento comprende 5 o más aminoácidos, o 10 o más nucleótidos que son contiguos en la molécula genitora de proteína o de ácido nucleico.

"Fragmento funcional" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a una sub-región aislada, o fragmento de una proteína descrita en la presente memoria, o a una secuencia de aminoácidos que, por ejemplo, comprende una región distinta de funcionalidad tal como un sitio activo para un receptor. Los fragmentos funcionales pueden ser producidos mediante tecnología de clonación, o como productos naturales de mecanismos de división alternativos.

El término "homologar" u "homólogo" describe la relación existente entre moléculas diferentes de ácido nucleico o secuencias de aminoácido, en las que dichas secuencias o moléculas están relacionadas por identidad parcial o por similitud en uno o más bloques o regiones dentro de dichas moléculas o secuencias. "Compuesto de ácido nucleico aislado" se refiere a cualquier secuencia de ARN o de ADN, ya sea construida o sintetizada, que esté en un posicionamiento distinto de su localización natural.

Según se utiliza en la presente memoria, "identidad o similitud", según se conoce en el estado de la técnica, son relaciones entre dos o más secuencias de polipéptido o dos o más secuencias de polinucleótido, según se determina mediante comparación de las secuencias. En la técnica, identidad significa también el grado de relación de secuencia entre secuencias de polipéptido y de polinucleótido, según sea el caso, según se determine mediante emparejamiento entre cadenas de tales secuencias. Tanto identidad como similitud pueden ser calculadas fácilmente (Biología Molecular Computacional, Lesk, A.M. ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Prensa Humana, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G. Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Tockton Press, New York, 1991). Aunque existe un número de métodos para medir identidad y similitud entre secuencias de dos polinucleótidos o de dos polipéptidos, ambos términos son bien conocidos por los expertos en la materia (Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux J., eds., M Stockton Press New York, 1991; y Carillo H., y Lipman, D., (1988) SIAM J. Applied Math., 48, 1073. Los métodos empleados habitualmente para determinar identidad o similitud entre secuencias incluyen, aunque sin limitación, los que se describen en Carillo, H., y Lipman, D., (1988) SIAM J. Applied Math., 48, 1073.

Los métodos para comparar la identidad y la similitud de dos o más secuencias son bien conocidos en el estado de la técnica. Así, por ejemplo, los programas disponibles en el Paquete de Análisis de Secuencia Wisconsin, versión 9.1 (Devereux J. et al., Ácido Nucleico Res., 12, 387-395, 1984), por ejemplo, los programas BESTFIT y GAP, pueden ser usados para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de similitud entre dos secuencias de péptidos o de polipéptidos. BESTFIT hace uso del algoritmo de "homología local" de Smith and Waterman (J. Mol. Biol., 147, 195-197, 1981) y encuentra la mejor región simple de similitud entre dos secuencias. BESTFIT es más adecuado para comparar secuencias de dos polinucleótidos o de dos péptidos o polipéptidos que sean de longitud disimilar, suponiendo el programa que la secuencia más corta representa una porción de la más larga. En comparación, GAP alinea dos secuencias, encontrando una "similitud máxima", de acuerdo con el algoritmo de Needleman y Wunsch (J.

Mol. Biol., 48, 443-453, 1970). GAP es más adecuado para comparar secuencias que sean aproximadamente de la misma longitud y de las que se espera un alineamiento sobre la totalidad de su longitud. Con preferencia, los parámetros "Gap Weight" y "Length Weight" usados en cada programa, son 50 y 3, para secuencias de polinucleótido, y 12 y 4 para secuencias de polipéptido, respectivamente. Con preferencia, el % de las identidades y de las similitudes se determina cuando las dos secuencias que son comparadas están óptimamente alineadas. Otros programas para determinar identidad y/o similitud entre secuencias, son también conocidos, por ejemplo la familia de programas BLAST (Altschul S F et al., Ácidos Nucleicos Res., 25: 3389-3402, 1997).

Una "sonda de ácido nucleico" o "sonda" según se utiliza en la presente memoria, es un compuesto de ácido nucleico, en particular un compuesto de ácido nucleico etiquetado, que hibridiza con otro compuesto de ácido nucleico. "Sonda de ácido nucleico" significa una secuencia de ácido nucleico de cadena simple que hibridizará con una secuencia de ácido nucleico objetivo de cadena simple. Una sonda de ácido nucleico puede ser un polímero de oligonucleótido o de nucleótido. Una "sonda" contendrá normalmente una porción detectable que puede estar unida al (a los) extremo(s) de la sonda o ser interior a la secuencia de la sonda. En una realización específica, "sonda" se usa también para referirse a un oligonucleótido, por ejemplo de alrededor de 25 nucleótidos de longitud, unido a un soporte sólido para su uso en "matrices" y "micro-matrices" según se ha descrito con anterioridad.

El término "iniciador" es un fragmento de ácido nucleico que funciona como sustrato de iniciación para elongación enzimática o sintética de, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico.

El término "hibridización" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un proceso en el que una molécula de ácido nucleico de cadena simple se une a una cadena complementaria mediante emparejamiento de base de nucleótido.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "modulación" incluye en sus diversas formas gramaticales (por ejemplo, "modulado", "modulación", "modulando", etc.), sobre-regulación, inducción, simulación, potenciación y/o relajación de inhibición, sí como inhibición y/o sub-regulación o supresión.

Una secuencia de ácido nucleico está "enlazada operativamente" a otra secuencia de ácido nucleico cuando la primera se sitúa en una relación funcional con la última. Por ejemplo, un ADN para pre-secuencia o péptido conductor de secreción está enlazado operativamente a ADN para un polipéptido si éste está expresado como una pre-proteína que participe en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador se encuentra enlazado operativamente a una secuencia de codificación si éste afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de enlace de ribosoma está enlazado operativamente a una secuencia de codificación si éste está posicionado de modo que facilite la traducción. En general, "operativamente enlazado" significa que las secuencias de ADN que están enlazadas son contiguas y, en caso de un conductor de secreción, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. El enlace se realiza mediante unión en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, se usan adaptadores o enlazadores de oligonucleótido sintéticos, de acuerdo con la práctica convencional.

La presente invención está basada en la identificación de un número de genes que están asociados a síntomas clínicos de CVH, más en particular con IBS. Estos genes han sido identificados mediante análisis de expresión diferencial de pacientes diagnosticados con IBS y controles sanos. Más en particular, la diagnosis de pacientes con IBS por parte de un gastroenterólogo fue confirmada mediante un cuestionario de enfermedad intestinal (Talley, et al., 1990) que incluía cuestiones que se corresponden con los criterios Roma II (Thompson et al., 1999). El cuestionario de enfermedad intestinal incluye también una lista de control de síntoma sicosomático prevista para identificar desórdenes y síntomas de somatización que caracterizan disepsia no ulcerosa, y ha sido usado extensamente en estudios epidemiológicos.

Según la presente invención, se han identificado genes cuya expresión en colon mucosal o bien se ha reducido o bien se ha incrementado en pacientes con CVH, más en particular con IBS, en comparación con controles sanos. Una ventaja particular de estos marcadores de expresión consiste en que existe una fuerte correlación entre la expresión de genes particulares y la ocurrencia de IBS, y que esos patrones de expresión tienen un valor predictivo. Por consiguiente, estos marcadores de expresión son útiles como herramienta de diagnóstico. Los marcadores de expresión no están necesariamente, e incluso en la mayor parte de los casos, relacionados con la presencia de polimorfismo en los genes correspondientes, distinguiéndolos de los marcadores genéticos.

Métodos de depuración

La presente invención describe moléculas de ácido nucleico y productos de gen (proteínas) que pueden ser usados en ensayos de depuración para identificar compuestos para su uso como terapéutica para el tratamiento de CVH, en particular de IBS.

Las proteínas codificadas por las moléculas de ácido nucleico que se describen en la presente memoria pueden ser usadas en la formación de enlaces y en ensayos funcionales para depurar los compuestos para el tratamiento de CVH, en particular de IBS. Según se discute para cada producto de gen, la capacidad para identificar ya sea un antagonista o ya sea un agonista podría proporcionar el desarrollo de nuevos tratamientos para IBS.

- 5 De ese modo, las moléculas de ácido nucleico son útiles para expresar las proteínas que han de ser aisladas y usadas en ensayos de formación de enlace directo. La expresión de proteína puede ser llevada a cabo en cualquier sistema celular, por ejemplo en células de plantas, procariotas (por ejemplo, E. coli), de levadura, células de insectos (por ejemplo, células Sf9, utilizando vectores de baculovirus), o células de mamíferos (por ejemplo, CHO, COS, etc.). Las técnicas para el aislamiento y la purificación de productos de proteína son bien conocidas en el estado de la técnica.

Los productos de proteína, o los fragmentos de la misma (por ejemplo, fragmentos proteolíticos o fragmentos sintéticos), pueden ser usados para generar anticuerpos específicos para detectar directamente expresión de proteína, por ejemplo mediante inmunoensayo.

- 15 Los perfiles de expresión genética pueden ser usados para compuestos que modulan la expresión de mRNA o de proteína de los genes expresados diferencialmente que se muestran en la Tabla 1. Un gen de ese tipo expresado diferencialmente se menciona como "gen de interés" y tales compuestos de modulación se mencionan como moduladores que pueden sobre- o sub- regular la transcripción de mRNA, o agonizar o antagonizar la actividad de la proteína. Tales compuestos son útiles, por ejemplo, para inhibir o estimular la expresión de genes encontrados para ser regulados en IBS. Los compuestos que modulan el perfil de expresión de uno o más de los genes pueden ser identificados fácilmente usando numerosos métodos de depuración conocidos en el estado de la técnica. Según se utiliza en la presente memoria, la expresión de un gen pueden ser determinada midiendo niveles de mRNA, niveles de proteína, o actividad de proteína usando técnicas estándar.

Se proporcionan métodos para identificar un compuesto candidato para el tratamiento de CVH, en particular para el tratamiento de IBS, comprendiendo dicho método:

- 25 a) puesta en contacto de una célula que expresa al menos un IBS-MSG con el compuesto que va a ser ensayado;
- b) determinación del nivel de expresión de dicho IBS-MSG, y
- c) comparación con el nivel de expresión de dicho IBS-MSG en ausencia de dicho compuesto;

- 30 en el que un compuesto capacitado para oponerse al cambio de nivel de expresión del IBS-MSG observado en IBS, es identificado como compuesto candidato para el tratamiento de CVH, en particular para el tratamiento de IBS.

- 35 El IBS-MSG, según se utiliza en los métodos de depuración, se selecciona típicamente en el grupo consistente en IBS1 [SEQ ID NO. 15], COP1, PSME2, F13A1, NCFR1, M160, KCNS3, LYZ, MS4A4A, HELLS, FRC4, MCM5, TAP2, LRAP, DTL, VSIG2, VSIG4 y MUC20; en particular, a partir del grupo consistente en IBS1 [SEQ ID NO. 15], COP1, PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1, M160, KCNS3, VSIG2; más en particular, en el grupo consistente en IBS1 [SEQ ID NO. 15], PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1 y VSIG2; incluso más en particular en el grupo consistente en MUC20, VSIG2 y VSIG4; más en particular el IBS-MSG usado en los métodos de depuración de la presente invención consiste en IBS1 [SEQ ID NO. 15], la célula es una célula de colon, más en particular una célula de colon mucosal.

- 40 Por ejemplo, los métodos comprenden, en la etapa (b), determinar la expresión de al menos dos genes diferentes, uno de los cuales se elige en el grupo consistente en IBS1 [SEQ ID NO. 15], COP1, PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1, M160, KCNS3, LYZ, MS4A4A, HELLS, FRC4, MCM5, TAP2, LRAP, DTL, VSIG2, VSIG4, MUC20, y el uno o más de los otros genes se elige en el grupo consistente en IBS1 [SEQ ID NO. 15], COP1, PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1, M160, KCNS3, LYZ, MS4A4A, HELLS, FRC4, MCM5, TAP2, LRAP, DTL, VSIG2, VSIG4, MUC20, CASP1, FCGR2A y CKB; determinando en particular la expresión de al menos dos genes elegidos en el grupo consistente en IBS1 [SEQ ID NO. 15], COP1, PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1, M160, KCNS3, LYZ, MS4A4A, HELLS, FRC4, MCM5, TAP2, LRAP, DTL, VSIG2, VSIG4 y MUC20; en particular al menos dos genes seleccionados en el grupo consistente en IBS1 [SEQ ID NO. 15], COP1, PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1, M160, KCNS3, VSIG2; más en particular, al menos dos genes del grupo consistente en IBS1 [SEQ ID NO. 15], PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1 y VSIG2; incluso más en particular al menos dos genes del grupo consistente en MUC20, VSIG2 y VSIG4; otros ejemplos comprenden, en la etapa (b), determinar la expresión de al menos dos genes, uno de los cuales es IBS1 [SEQ ID NO. 15], siendo el otro elegido en el grupo consistente en COP1, PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1, M160, KCNS3, LYZ, MS4A4A, HELLS, FRC4, MCM5, TAP2, LRAP, DTL, VSIG2, VSIG4, MUC20, CASP1, FCGR2A y CKB.

- 55 Para cada una de las realizaciones descritas de la misma, la etapa (c) consiste en comparar el nivel de expresión de dichos al menos dos genes mediante dichas células después de haber puesto en contacto cada célula con el citado compuesto, con la expresión de dichos genes por medio de dichas células en ausencia de dicho compuesto.

- Según se utiliza en la presente memoria, el nivel de expresión de un IBS-MSG puede ser detectado a nivel del ácido nucleico o a nivel de la proteína. La determinación del nivel de expresión a nivel del ácido nucleico puede ser llevada a cabo utilizando cualquier tecnología disponible para medición de niveles de transcripción de gen. Por ejemplo, el método podría emplear hibridización *in situ*, hibridización Northern o hibridización en una micro-matriz de ácido nucleico, tal como una micro-matriz de oligonucleótido o una micro-matriz de cADN. Alternativamente, el método podría emplear reacción de cadena de polimerasa de transcriptasa reversa (RT-PCR) tal como PCR en tiempo real en base a tinte fluorescente (PCR TaqMan®). En la sección de ejemplo que se proporciona en lo que sigue, los niveles de expresión de ácido nucleico fueron obtenidos mediante hibridización de cARN etiquetado derivado del mARN celular total en micro-matrices de oligonucleótido GeneChip® de Affymetrix, y usando RTQ-PCR (PCR TaqMan®). Los niveles de expresión a nivel de la proteína pueden ser evaluados usando cualquier tecnología disponible para medir niveles de proteína. Por ejemplo, el método podría emplear tecnología de micro-matriz de proteína, mancha Western, inmunocitoquímica, SDS-PAGE, cuantificación relativa usando espectrometría de masas y pre-etiquetado de células con formas isotopoméricas de aminoácidos esenciales (Unwin R.D., Evans, C.A. y Whetton A.D., 2006, TENDENCIAS en Biochemical Sciences, Vol. 31(8); 473-484).
- Con preferencia, el nivel de expresión se determina a nivel del ácido nucleico. En este caso, el mARN o el cADN pueden ser usados directamente a efectos de detección o pueden ser amplificados enzimáticamente usando PCR u otras técnicas de amplificación con anterioridad al análisis. Con preferencia, dichos métodos de análisis comprenden el uso de una sonda de oligonucleótido etiquetada objetiva respecto a una región adecuada del oligonucleótido, la expresión de gen se determina usando una sonda que se enlaza a un IBS-MSG según se reivindica. Las sondas de oligonucleótido se describen en la Tabla 1 y en la Tabla 2 que siguen.

TABLA 2

DESCRIPCIÓN DE LOS CONJUNTOS DE SONDA**Sondas específicas CASP1**

caspara 1, cisteína peptidasa relacionada con apoptosis (interleuquina 1, beta, convertasa)

25	ID rafseq (NCBI):	NM_001223
	SwissProt:	P29466
	ID de proteína rafseq (NCBI)	NP_001214.1

SEQ ID No. 1

30 206011_at CASP1

>HG-U133_PLUS_2:206011_AT

aatgctctaaaatccaacactgtgtgagcgcccatgatattcaaaggaaatgtttattgaacatttcaaattanaggttttg
gattagggatgctaaccagtaagtatacagctgaattccaatatacaaaaatatctgaaatttgaatacttctgtagcatgc
atgttgataagggataatcaagccatatacagaaaatactgaagtaatgcccttcttctggtcagtcagagcacgttgctctt
ctcccaaagttttcatttagacccttttgagattcatctgatattggcctagaagtggccgtaagactacaacccctcacttttg
gatgtttctctcttcacctcagcagggtatatttaacatagcatgtgtgtcttcttttaaaattgtgtatgttccattgggtgta
taactttataacttgcatgtcttt

35

Genbank: AI719655 (nt 1539-1970)

SEQ ID No.2

211367_s_at

CASP1

>HG-U133_PLUS_2:211367_S_AT

gagctgaggtgacatcacaggcatgacaatgctgctacaaaatctgggtacagcgtagatgtgaaaaaatctcactgc
ttcggacatgactacagagctggaggcattgcacaccgccagagcacaagacctctgacagcacgttcctgggttcatg
tctcatggtattcgggaaggcattgtgggaagaacactctgagcaagtcccagatatactacaactcaatgcaatcttaac
atgttgaataccaagaactgccaagtgtgaaggacaaccgaaggtgatcatcatccaggcc

Genbank: U13699 (nt 275-561)

SEQ ID No.3

211366_x_at

CASP1

>HG-U133_PLUS_2:211366_X_AT

gcacaagacctctgacagcacgttcctgggtgtcatgtctcatggtattcgggaaggcattgtgggaagaacactctgagc
aagtcccagatatactacaactcaatgcaatcttaacatgttgaataccaagaactgccaagtgtgaaggacaaaccgaag
gtgatcatcatccaggcctgccgtggtgacagccctgggtgtggtgtgtttaaagattcagtaggagtttctggaaacctatctt
taccactacagaagagtttgaggatgatgctattaagaaagcccacatagagaaggattttatcgcttctgctctccacac
cagataatgtttcttgagacatcccacaatgggctctgttttattggaagactcattgaacatatgcaagaatatgcctgttcct
gtgatgtggaggaaatttccgcaagggttcgattttcatttgagcagccagatggtagagcgcagatgccaccactgaaag
agtgactttgacaagatgttctacctcttccaggacattaaa

Genbank:

U13698 (nt 402-925)

SEQ ID No.4

209970_x_at

CASP1

>HG-U133_PLUS_2:209970_X_AT

cgaaggtgatcatcatccaggcctgccgtggtgacagccctgggtgtggtgtgtttaaagattcagtaggagtttctggaac
ctatctttaccaactacagaagagtttgaggatgatgctattaagaaagcccacatagagaaggattttatcgcttctgctcttc
cacaccagataatgtttcttgagacatcccacaatgggctctgttttattggaagactcattgaacatatgcaagaatatgcct
gttcctgtgatgtggaggaaatttccgcaagggttcgattttcatttgagcagccagatggtagagcgcagatgccaccactg
aaagagtgactttgacaagatgttctacctcttccaggacattaaa

Genbank:

M87507 (nt 859-1133)

SEQ ID No.5

211368_s_at

CASP1

>HG-U133_PLUS_2:211368_S_AT

aatgtttcttgagacatcccacaatgggctctgttttattggaagactcattgaacatatgcaagaatatgcctgttcctgtgat
gtggaggaaatttccgcaagggttcgattttcatttgagcagccagatggtagagcgcagatgccaccactgaaagagtg
ctttgacaagatgttctacctcttccaggacattaaaat

Genbank: U13700 (nt73-258)

seudo-ICE inhibidor negativo dominante de caspasa-1

ID de refseq (NCBI) NM_001017534

SwissProt: Q5EG05

ID de proteína refseq NP_001017534.1

5

SEQ ID No. 6

1552703_s_at COP1

>HG-U133_PLUS_2:1552703_S_AT

ttccatgggtgaagggtacaataaatggcttactggatgaattattacagacaaggggtgctgaaccaggaagagatggagaaa
gtaaaacgtgaaaatgctacagtatggataagacccgagctttgattgactccgttattccgaaaggggcacaggcatgcc
aaatttgcacacatacatttgaagaagacagttacctgg

10

Genbank: NM_0527889 (nt 86-267)

SEQ ID No. 7

1552701_a_at COP1

15

>HG-U133_PLUS_2:1552701_A_AT

aggtcgatacctggaaattagcttagtacacaagactcccaattactatttct

Genbank: NM_052889 (nt 314-344)

Sonda específica PSME2

Subunidad 2 (PA28 beta) activadora de proteasoma (prosome, macropain)

20

ID de refseq (NCBI) NM_002818

SwissProt Q2TNB3

ID de proteína refseq (NCBI) NP_002809.2

SEQ ID No. 8

201762_s_at PSME2

25

>HG-U133_PLUS_2:201762_S-AT

caacacctgatccccaagattgaagatggaaatgattttgggtagcaatccaggagaaggtgctggagagggatgaatgcc
gtcaagaccaagtggagcttccagacaaccatttccaagtacttccagaaacgtggggatgctgtggccaaggcctcca
aggagactcatgtaattgattaccgggccttggatgagcgagatgaggcagcctatggggagctcagggccatggtg
ctggacctgagggccttctatgctgagctttatcatatcatcagcagcaacc

Genbank: NM_002818 (nt 453-723)

Sonda específica F13A1

30

factor de coagulación XIII, polipéptido A1

ID de refseq (NCBI) NM_000129

SwissProt P00488

ID de proteína refseq (NCBI): NP_000120.1

SEQ ID No. 9

203305_at F13A1

>HG-U133_PLUS_2:203305_AT

5

gtccttcacatcaccattttgagacctcagcttggcactcaggtgctgaagggtaatatggactcagccttgcaaatagccagt
gctagtctgacccaaccacagaggatgctgacatcattgtattatgttccaaggctactacagagaaggctgcctgctatgt
atttgaaggctgatttatggcagaatttccctctgatatgtctagggtgtgatttaggtcagtagactgtgattcttagcaaaaa

atgaacagtataagataactgggggcaaaatcagaatggaatgctctggctctatataaacacatttctgagcctttgagactg
ttcctgagccttcagcactaacctatgagggtgagctggctccctctatatatacatcatacttaactttactaagtaatctcaca
gcatttccaagtctcccaatatccaatt

Genbank: NM_000129 (nt 3289-3718)

=====

10

Sonda específica NCF4

factor 4 citosólico neutrofilo, 4,40 kDa

ID de refseq (NCBI): M_000631

SwissProt: Q15080

ID de proteína refseq (NCBI) NP_000622.2

15

SEQ ID No. 10

205147_x_at NCF4

>HG-U133_PLU&S_2:205147_X_AT

agcagaggctctatttgacttcactggaacagcaaactggagctgaatttcaaagctggagatgtgatcttctcctcagtcg
gatcaacaaagactggctggagggcactgtccggggagccacgggcatcttccctctccttcgtgaagatcctcaaaga
cttccctgaggaggacgacccccaactggctgcgttgctactactacgaagacaccatcagcacatcaaggacatcgc
ggtggaggaagatcagcagcactcccattgaagacctgctggagctcacaaggcgggagttccagagaggac
atagctctgaattaccgggacgtgagggggaatctggttcggtgctgctggtgataggacgtagcgctcatggtgcggcag
gctcgtggcctcccctcccagaagcgcccttccctggagctgcacatcacgcagaaggacaactacagggtctacaac
acgatgccat

20

Genbank: M_000631 (nt 690-1162)

=====

Sonda específica M160

Proteína M160 de tipo 1 rica en cisteína de receptor barredor, precursor (molécula CD 163, como 1)

25

ID de refseq (NCBI) NM_174941

SwissProt: Q2M387 (NCBI)

ID de proteína refseq NP_777601.2

SEQ ID No. 11

223665_at

M160 (CD163L1)

>HG-U133_PLUS_2:223665_AT

tctatgggactgtcacgccaaccctggggacagagtactgtggacacaaggaagatgctggcgtgaggtgctctggac
agtcgctgaaatcactgaatgcctcctcaggctgttagcactatattatccagtatcttgggctccttctcccggttctgttatt
ctatttctcacgtggtgccgagttcagaacaaaaacatctgccccctcagagttcaaccagaaggagggttctctcaggga
gaatttattccatgagatggagacctgcctcaagagagaggaccacatgggacaagaacctcagatgacacccccaacc
atggttgtaagatgctagcgacacatcgctgttgggagttcttctgcctctgaagccacaaaatgactttagacttccaggg
ctcaccagatcaacctctaataat

5

Genbank: NM_174941

(nt 4000-4415)

=====

Sonda específica CSF1R

receptor de factor 1 de simulación de colonia

10

ID de refseq (NCBI):

NM_005211

SwissProt:

P07333

ID de proteína refseq (NCBI):

NP_005202.02

SEQ ID No. 12

203104_at CSF1R

15

>HG-U133_PLUS_2:203104_AT

tgttggcctcgtgttctatgccaaactagtagaaccttcttctaatccccttattctcatggaaatggactgactttatgcctat
gaagtccccagggagctactgatactgagaaaaccaggctcttggggctagacagactggcagagagtgagatctccct
ctctgagaggagcagcagatgctcacagaccacactcagctcaggcccttggagcaggatggctccttaagaatctcac
aggacctttagtctctgccctatacgcgccttactccacagcctcaccctcccaccccatctggtactgctgtaatga
gccaagtggcagctaaaagtgggggtgttctgccagtcctcattctgggctagaaggcaggggaccttggcattggct
ggccacaccaagcaggaagcacaactcccccaagctgactcatcctaactaacagtcacgccgtg

Genbank:

NM_005211 (nt 3485-3942)

=====

20

Sonda específica FCGR2A

Fragmento Fc de IgG, Ila de baja actividad, receptor (CD32)

ID de refseq (NCBI):

NM_021642

SwissProt:

P12318

ID de proteína refseq (NCBI)

NP_=67674.2

25

SEQ ID No. 13

203561_at

FCGR2A

>HG-U133_PLUS_2:203561_AT

tgctgggatgaccagcatcagccccaatgtccagcctctttaacatcttcttctatgccctctctgtggatccctactgctggt
tcttgccttctccatgctgagaacaaaatcacctattcactgcttatgcagtcggaagctccagaagaacaaagagcccaatta
ccagaaccacattaagctccattgtttgccttgggatttgagaagagaattagagaggtagggatctggtatttcttgacta
aatcccccttggggaagacgaagggatgctgcagttccaaaagagaaggactcttcagagtcattacctgagtcctaaa
gctccctgtcctgaaagccacagacaatatgggtcccaatgactgactgcaccttctgtgcctcagccgttcttgacatcaag
aatcttctgttccacatccacacagccaataacaattagtcaaacactgttattaacagatgtagcaacatgaagacgctatgt
tacaggttaca

Genbank: NM_021642

(nt 1710-2200)

=====

Sonda específica KCNS3

5 canal con puerta de tensión de potasio, rectificador retardado, subfamilia S, miembro 3

ID de refseq (NCBI): NM_002252

SwissProt: Q9BQ31

ID de proteína refseq (NCBI): NP_002243.3

10

SEQ ID No. 14

205968 at KCNS3

>HG-U133_PLUS_2:205968_AT

attgtggtgagcgatcctgactccacagatgcttcaagcattgaagacaatgaggacatttgtaaccaccctcttgagaa
ttgcacagcaaaatgagcgggggtgtttgtcctgtttctctatccttcccaacattaggttaacacagctttataaacctcag
gggttcgtaaaaatcatitaattctcaggggtgacctttccagccatagtggacattcattgtcgaattctgaaatgatagaattg
tctttatttttctgtgagggtcaattaaatgccttgtcttgaaattatttttacaagagagagtgtgatatagtttggaataaga
taaagtgtattgggtgggtgttggtcacagcttatgcatcatctgtgtttgtcatttactacattgagctaacitaaactg
acaagtagaatcaagggtgcagctgactgagacgacatgc

15

Genbank: NM_002252 (nt 1521-1973)

=====

Sonda específica IBS1

Proteína DKFZP564O0823

ID de refseq (NCBI): NM 015393

SwissProt: Q6UWI2

ID de proteína refseq (NCBI): NP_56208.2

25

SEQ ID No. 15

204687 at DKFZP564O0823 (IBS1)

>HG-U133 PLUS 2:204687 AT

aatctctatttactgtgttttctgacaggatgctgcctgcttgctctacaagctggaagcagcttcttagctgcctaattaat
 gaaagatgaaataggaagtgcctggaggggccagcaggtcacggggcagaatctctcaggttgctgtggatctcag
 tgtgccctacctgttctccctccaggccacctgtctctgtaaaggatgtctgctgttcaaaaggcagctgggatccagc
 ccacaagtgatcagcagagttgcatttcaaagaaaaaggctatgagatgagctgagttatagagagaaggagaggcat
 gtacggtgtggggaagtggagggaagctggcgggggagaaggaggtaacctgcactgagtacttcattaggacaagt
 gagaalcagctattgataatggccagagatatccacagcttgaggaggccagagaccgtttgtttataccacacagcaa
 ctggtccactgctttactg

Genbank: NM_015393 (nt 1602-2089)

=====

5

Sonda específica VSIG2

V-set y dominio de inmunoglobulina que contiene, 2

ID de refseq (NCBI): NM_014312

SwissProt: Q96IQ7

ID de proteína refseq (NCBI): NP_055127.2

10

SEQ ID No. 16

229369_at VSIG2

>HG-U133_PLUS_2:229369_AT

ggggtggcgcaaggaggaggaaaggccttgagttaaaagcgggtgcctgcaaccctcaaactccgacatcattcagtg
 gtttagggggcaggaggtgtgttcagccgtggaatttctgtgtggcagcagtgtaacctgtgtatttgagggtacaggcaanc
 ggtacagggtggagtggtgtccacaagctgtggcagggaagctgtttgcaggactgccctgcc

15

Genbank: AI201858 (nt 940-1143)

Alternativamente, el nivel de transcripción de gen se determina a nivel de la proteína y la presente descripción proporciona un método para identificar un compuesto candidato para el tratamiento de CVH, en particular para el tratamiento de IBS, comprendiendo dicho método:

- a) poner en contacto una célula que expresa al menos un IBS-MSG con el compuesto que va a ser probado;
- b) determinar el nivel de proteína de dicho IBS-MSG, y
- c) comparar con el nivel de proteína de dicho IBS-MSG en ausencia de dicho compuesto,

en el que un compuesto capacitado para oponerse al cambio en el nivel de proteína del IBS-MSG observado en el IBS, es identificado como un compuesto candidato para el tratamiento de CVH, en particular para el tratamiento de IBS.

- 25 Con preferencia, el nivel de proteína se determina usando un anticuerpo que se enlaza con el producto de IBS-MSG. En particular, usando un anticuerpo que se enlaza a un polipéptido codificado mediante un IBS-MSG seleccionado en el grupo consistente en IBS [SEQ ID NO. 15] COP1, PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1, M160, KCNS3, LYZ, MS4A4A, HELLS, FRC4, MCM5, TAO2, LRAP, DTL, VSIG2, VSIG4 y MUC20; en particular, en el grupo consistente en IBS1 [SEQ ID No. 15], COP1, PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1, MS160, KCNS3, VSIG2; más en particular, en el grupo consistente en IBS1 [SEQ ID NO. 15], PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1 y VSIG2; incluso más en particular en el grupo consistente en MUC20, VSIG2 y VSIG4; más en particular el IBS-MSG usado en los métodos de depuración consiste en IBS1 [SEQ ID NO. 15].

- 35 De acuerdo con un ejemplo particular, estos métodos comprenden, en la etapa (b), determinar el nivel de proteína del producto de gen de al menos dos genes diferentes, uno de los cuales se elige en el grupo consistente en IBS1 [SEQ ID NO. 15], COP1, PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1, M160, KCNS3, LYZ, MS4A4A, HELLS, FRC4, MCM5, TAP2, LRAP, DTL, VSIG2, VSIG4, MUC20, y el uno o más de los otros genes se selecciona en el grupo consistente

en IBS1 [SEQ ID NO. 15], COP1, PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1, M160, KCNS3, LYZ, MS4A4A, HELLS, FRC4, MCM5, TAP2, LRAP, DTL, VSIG2, VSIG4, MUC20, CASP1, FCRG2A y CKB; determinar en particular el nivel de proteína del producto de gen de al menos dos genes seleccionados en el grupo consistente en IBS1 [SEQ ID NO. 15], COP1, PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1, M160, KCNS3, LYZ, MS4A4A, HELLS, FRC4, MCM5, TAP2, LRAP, DTL, VSIG2, VSIG4 y MUC20; en particular, al menos dos genes seleccionados en el grupo consistente en IBS1 [SEQ ID NO. 15], COP1, PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1, M160, KCNS3, VSIG2; más en particular, al menos dos genes del grupo consistente en IBS1 [SEQ ID NO. 15], PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1 y VSIG2; incluso más en particular, al menos dos genes del grupo consistente en MUC20, VSIG2 y VSIG4; otros ejemplos comprenden en la etapa (b) determinar el nivel de proteína de al menos dos productos de gen, uno de los cuales es el gen IBS1 [SEQ ID NO. 15], siendo el otro seleccionado en el grupo consistente en los productos de gen de COP1, PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1, M160, KCNS3, LYZ, MS4A4A, HELLS, FRC4, MCM5, TAP2, LRAP, DTL, VSIG2, VSIG4, MUC20, CASP1, FCRG2A y CKB.

Los anticuerpos generados frente a polipéptidos según se describe en la presente memoria, pueden ser obtenidos administrando los polipéptidos o fragmentos portadores de epítipo, análogos o células que expresan éstos, a un animal, con preferencia un animal no humano, usando protocolos rutinarios. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, se puede usar cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos de línea celular continua. Los ejemplos incluyen la técnica hybridoma (Kohler, G. y Milstein, C., Nature (1975) 256: 495-497), la técnica trioma, la técnica hybridoma de célula B humana (Kozbor et al., Inmunología Hoy (1983) 4: 72) y la técnica EBV-hybridoma (Cole et al., ANTICUERPOS MONOCLONALES Y TERAPIA DE CÁNCER, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena simple, tal como las que se describen en la Patente U.S. núm. 4.946.778, pueden ser también adaptadas para producir anticuerpos de cadena simple en polipéptidos. También, los ratones transgénicos u otros organismos, incluyendo otros mamíferos, pueden ser usados para expresar anticuerpos humanizados.

Los anticuerpos descritos anteriormente pueden ser empleados para aislar o para identificar clones que expresen el polipéptido o para purificar los polipéptidos mediante cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos frente a polipéptidos pueden ser empleados también para tratar CVH, en particular para el tratamiento de IBS.

Para determinar la cantidad de proteína, los anticuerpos se usan en técnicas inmunológicas convencionales. Las técnicas inmunológicas adecuadas son bien conocidas por los expertos en la materia, e incluyen, por ejemplo ELISA, análisis de mancha Western, inmunoensayos competitivos o en sándwich, y similares. Según es también bien conocido, todos ellos dependen de la formación de un complejo inmune de antígeno-anticuerpo a los efectos del ensayo, pudiendo el anticuerpo estar etiquetado detectablemente con, por ejemplo, una radio-enzima o con etiquetas fluorescentes, o pudiendo estar inmovilizado sobre portadores insolubles.

Por ejemplo, en un formato de depuración ELISA, el anticuerpo se añade a una fase sólida (por ejemplo, el fondo de una micro-placa) que está recubierta ya sea con proteína o ya sea con un fragmento de péptido de la misma, acoplada a un portador (tal como BSA) y a continuación, se añade un anticuerpo anti-inmunoglobulina (por ejemplo, cuando se realiza la inmunización en ratones, se usa un anticuerpo de inmunoglobulina anti-ratón, por ejemplo inmunoglobulina (Ig) de oveja anti-ratón) conjugado con una etiqueta detectable tal como una enzima, con preferencia peroxidasa de rábano picante, o un isótopo radiactivo tal como ¹²⁵I.

El ácido nucleico individual y/o el producto de gen pueden ser usados inicialmente en un método de depuración para identificar "compuestos candidato" que se enlacen específicamente con el gen o producto de gen particular. Una vez identificado, el compuesto candidato puede ser usado además en ensayos basados en células o basados en animales completos para determinar su efecto sobre la expresión del ácido nucleico particular, o la expresión o la actividad (es decir, la función) del producto de gen, en relación con una célula de un animal de control sin tratar que exprese el mismo ácido nucleico y/o producto de gen. Para el presente método, la expresión puede ser detectada en células tratadas adicionalmente o sin tratar con medicamentos usados habitualmente para tratar IBS, por ejemplo probióticos, incluyendo Lactobacillus y Bifidobacterium; agentes antiinflamatorios, antagonistas de PAR-2 y alternativas que inhiban la actividad de caspasa, tal como por ejemplo N¹-3-metilbutiril-N⁶-6-aminohexanoil-piperazina; CNI-1493 o pralnacasan. Se pueden usar ensayos de cultivo celular que utilizan células de colon, por ejemplo células Caco-2 o HT-29, para determinar si un compuesto de prueba funciona como modulador de expresión. Por ejemplo, las células se ponen en contacto con un compuesto de prueba y el efecto del compuesto sobre la expresión se evalúa en relación con una célula correspondiente que no esté en contacto con un compuesto de prueba. Según se utiliza en la presente memoria, el término "célula correspondiente" se refiere a una célula de una muestra separada de la muestra de ensayo que es, con preferencia, una célula del mismo tipo del mismo tipo de tejido que la célula que se está ensayando.

La presente descripción proporciona un método de depuración para identificar y obtener un compuesto candidato para el tratamiento de CVH, en particular para el tratamiento de IBS, comprendiendo dicho método:

- a) incubar un producto de IBS-MSG con el compuesto que va a ser probado, y
- b) determinar la capacidad de dicho compuesto para enlazar con el producto de IBS-MSG; en el que un compuesto capaz de enlazar con el producto de IBS-MSG es un compuesto candidato para el tratamiento de IBS.

- 5 En estos ensayos de enlace, el producto de IBS-MSG consiste típicamente en el polipéptido codificado por dicho gen o fragmentos del mismo, y la capacidad del compuesto para enlazar con dicho polipéptido se determina usando procedimientos conocidos en el estado de la técnica, tal como por ejemplo los descritos por Ausubel et al. (Protocolos Usuales en Biología Molecular, Wiley Interscience, New York, 2001). En una versión alternativa, el producto de IBS-MSG es un polinucleótido transcrito del gen de IBS-MSG, o un fragmento del mismo.
- 10 En un ejemplo de trabajo particular, un compuesto candidato que enlaza con un polipéptido, puede ser identificado usando una técnica basada en cromatografía. Por ejemplo, un polipéptido recombinante puede ser purificado mediante técnicas estándar de células de diseño de ingeniería que expresan el polipéptido (por ejemplo, las que se han descrito en lo que antecede) y que pueden estar inmovilizadas en una columna. Una solución de compuestos candidato se hace pasar a continuación a través de la columna, y se identifica un compuesto específico para el
- 15 polipéptido inmovilizado sobre la base de su capacidad para enlazar con el polipéptido y ser inmovilizado en la columna. Para aislar el compuesto, la columna se lava para eliminar moléculas enlazadas no específicas, y el compuesto de interés se libera a continuación de la columna y se recoge. Se pueden usar métodos similares para aislar un compuesto enlazado a una micro-matriz de polipéptido. Los compuestos aislados mediante este método (o cualquier otro método apropiado), pueden ser, si se desea, purificados adicionalmente (por ejemplo, mediante
- 20 cromatografía líquida de alto rendimiento). Además, estos compuestos candidato pueden ser probados en cuanto a su capacidad para alterar (por ejemplo, aumentar o reducir) la actividad de un polipéptido. Los compuestos aislados mediante esta alternativa pueden ser también usados, por ejemplo, como productos terapéuticos para tratar IBS en un sujeto humano. Los compuestos que se identifican como ligantes para un polipéptido con afinidad constante menor o igual que 10 μM , son considerados particularmente útiles y en lo que sigue se mencionan también como
- 25 agentes de enlace específicos.

Alternativamente, el ensayo de enlace comprende además la presencia de una agente ligante específico para el IBS-MSG de interés, es decir tanto un anticuerpo como otro agente que se sepa que enlaza con el gen de interés. Para los IBS-MSGs, se proporciona una lista de anticuerpos conocidos comercialmente disponibles y de agonistas conocidos en lo que sigue. En el ensayo de enlace, la capacidad del compuesto de prueba para enlazar con el IBS-MSG se evalúa midiendo el efecto del compuesto de prueba sobre la interacción entre el IBS-MSG y el agente

- 30 ligante específico.

Ejemplos de Anticuerpos (monoclonales o policlonales) comercialmente disponibles para genes relacionados en la Tabla 1:

Anticuerpo anti-CASP1 humano (Abnova Corporation, Calbiochem, Novus Biologicals)

- 35 Anticuerpo anti-NCF4 humano (Abnova Corporation, Abcam, GeneTex, Novus Biologicals)

Anticuerpo anti-lizosima humano (BIODESIGN International)

Anticuerpo anti-PSME2 humano (Abnova Corporation, Novus Biologicals)

Anticuerpo anti-HELLS humano (Abnova Corporation, Bethyl Laboratories, GeneTex, Novus Biologicals)

Anticuerpo anti-COP1 humano (Abnova Corporation, IMGENEX, Novus Biologicals)

- 40 Anticuerpo anti-MCM5 humano (Abcam, AbD Serotec, BD Biosciences Pharmingen, Bethyl Laboratories, BioLegend, GeneTex, Lab Vision, Novus Biologicals)

Anticuerpo anti-TAP2 humano (Abgent, BD Biosciences Pharmingen)

Anticuerpo anti VSIG2 (Abcam: anticuerpo de timocitos corticales monoclonal de ratón, ab 24235 – reacciones con humanos)

- 45 **Ejemplos de agonistas para proteínas codificadas por los genes relacionados en la Tabla 1:**

Activación de LIZOZIMA (agonistas)

- ciclosporina A (inducción de liberación de lizozima)
- 1-etil-benzimidalinona (1-EBIO)
- Carbacol

- Tapsigargina
- Fenilefrina

Activación de NADPH OXIDASA:

- angiotensina II [Ang II]
- PMA
- TNF-alfa
- factores de crecimiento
- trombina
- miristato acetato de forbol (PMA)

Activación de PSME2 y TAP2:

- Interferón-gamma

Para la detección de moléculas capaces de enlazar con los genes de interés usando los ensayos de depuración mencionados en lo que antecede, la molécula que enlaza específicamente con el gen de interés (por ejemplo, anticuerpo, agonista o sonda de polinucleótido) puede estar etiquetada detectablemente en virtud de contener un átomo (por ejemplo, un radionucleído), una molécula (por ejemplo, fluoresceína) o un complejo que, debido a una propiedad física o química, indique la presencia de la molécula. Una molécula puede estar también etiquetada detectablemente cuando está enlazada covalentemente a, o asociada de otro modo con, una molécula "informadora" (por ejemplo, una biomolécula tal como una enzima) que actúa sobre un sustrato para producir un átomo, una molécula u otro complejo detectable. Las etiquetas detectables adecuadas incluyen cualquier una composición detectable con medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inorgánicos, eléctricos, ópticos o con otros medios. Las etiquetas útiles incluyen biotina para manchar con conjugado de avidina o estreptavidina etiquetada, perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads), tintes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, fluoresceína-isotiocianato (FITC), rojo Texas, rodamina, proteína fluorescente verde, proteína fluorescente verde potenciada, lisamina, ficoeritrina, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, FluorX [Amersham], SyBR Verde I & II [Sondas Moleculares], y similares), radioetiquetas (por ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , o ^{32}P), enzimas (por ejemplo hidrolasas, en particular fosfatasa tales como la fosfatasa alcalina, esterasas y glicosidasas, u oxidoreductasas, en particular peroxidasas tal como la peroxidasa de rábano picante, y similares), sustratos, co-factores, inhibidores, grupos quimioluminiscentes, agentes cromogénicos, y etiquetas colorimétricas tal como perlas de oro coloidal o vidrio coloreado o plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.). Las patentes que enseñan el uso de tales etiquetas incluyen las Patentes U.S. núms. 3.817.837, 3.850.752, 3.939.350, 3.996.345, 4.277.437, 4.275.149 y 4.366.241.

Los medios de detección de tales etiquetas son bien conocidos por los expertos en la materia. Así, por ejemplo, las etiquetas radioluminiscentes y radiactivas pueden ser detectadas usando película fotográfica o contadores de centelleo, y los marcadores fluorescentes pueden ser detectados usando un fotodetector para detectar la luz emitida (por ejemplo, como en clasificación de célula activada por fluorescencia). Las etiquetas enzimáticas son detectadas típicamente mediante la provisión de la enzima con un sustrato y la detección de un producto de reacción coloreado producido por la acción de la enzima sobre el sustrato. Las etiquetas colorimétricas son detectadas visualizando simplemente la etiqueta coloreada. De ese modo, por ejemplo, cuando la etiqueta es una etiqueta radiactiva, los medios para la detección incluyen un contador de centelleo, película fotográfica como en la autoradiografía, o formación de imágenes de fósforo de almacenamiento. Cuando la etiqueta es una etiqueta fluorescente, ésta puede ser detectada excitando el fluorocromo con la longitud de onda apropiada de la luz y detectando la fluorescencia resultante. La fluorescencia puede ser detectada visualmente, por medio de película fotográfica, mediante el uso de detectores electrónicos tal como dispositivos acoplados por carga (CCDs) o fotomultiplicadores y similares. De manera similar, las etiquetas enzimáticas pueden ser detectadas proporcionando los sustratos apropiados para la enzima y detectando el producto de reacción resultante. También, las etiquetas colorimétricas simples pueden ser detectadas observando el color asociado a la etiqueta. La transferencia de energía por resonancia de fluorescencia ha sido adaptada para detectar el enlace de ligandos sin etiquetar, los cuales pueden ser útiles en matrices.

La evaluación de interacciones de enlace puede ser realizada además usando tecnología Biacore, en la que el polipéptido de IBS-MSG o su asociado de enlace está enlazado a un microchip, ya sea directamente por modificación química o ya sea ligado mediante asociación de epítopo de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo para el polipéptido de IBS-MSG), anticuerpo dirigido a una etiqueta de epítopo (por ejemplo, etiquetado como Hag) o una proteína de fusión (por ejemplo, GST). Una segunda proteína o proteínas es/son aplicada(s) a continuación mediante flujo sobre el "chip" y se detecta el cambio de señal. Finalmente, los compuestos de prueba se aplican mediante flujo sobre el "chip" y se detecta el cambio de señal.

Las clases de compuestos que pueden ser identificados mediante tales ensayos de depuración incluyen, aunque sin limitación, moléculas pequeñas (por ejemplo, moléculas orgánicas o inorgánicas que sean de un peso molecular menor que 2 kD, más preferentemente menor que un peso molecular de 1 kD, y/o sean capaces de cruzar la barrera sangre-cerebro o conseguir entrar en una célula apropiada y afectar a la expresión del gen relevante o a la actividad del producto de gen relevante). Los compuestos identificados por estos ensayos de depuración pueden incluir también polipéptidos, tal como péptidos solubles, péptidos de fusión, miembros de librerías combinatorias (tal como las descritas por Lam et al., Nature 1991, 354: 82-84; y por Houghten et al., Nature 1991, 354: 84-86); miembros de librerías derivados de química combinatoria, tal como librerías moleculares de aminoácidos de configuración D- y/o L-; fosfopéptidos, tal como miembros de librerías fosfopéptidas dirigidas, aleatorias o parcialmente degeneradas (véase, por ejemplo, Songyang et al., Cell 1993, 72: 767-778); librerías de péptidos derivadas del "método fago" (Scott y Smith, Science 1990, 249: 386-390; Cwirla, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87: 6378-6382; Devlin et al., Science 1990, 49: 404-406); productos químicos procedentes de otras librerías químicas (Geysen et al., Molecular Immunology 1986, 23: 709-715; Geysen et al., J. Immunologic Methods 1987, 102: 259-274; Fodor et al., Science 1991, 251: 767-773; Furka et al., 14º Congreso Internacional de Bioquímica 1998, Volumen & núm. 5, Resumen FR: 013; Furka, Int. J. Peptide Protein Res. 1991, 37: 487-493; Patente U.S. núm. 4.631.211; Patente U.S. núm. 5.010.175; Needles, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90: 10700-4; Ohlmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90: 10922-10926; Publicación PCT núm. WO 92/00252, y Publicación PCT núm. WO 94/28028); y grandes librerías de compuestos sintéticos o naturales disponibles a partir de una diversidad de fuentes, incluyendo Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, UK), Comgenex (Princeton, NJ), Brandon Associates (Merrimack, NH), Microsource (New Milford, CT), Aldrich (Milwaukee, WI), Pan Laboratories (Bothell, WA) y MycoSearh (NC) (véase, por ejemplo, Blondelle et al., TIBTech 1996, 14: 60).

Ensayos de diagnóstico

Los polinucleótidos descritos en la presente memoria van a ser usados como reactivos de diagnóstico. La detección de una forma mutada de un IBS-MSG seleccionado en el grupo consistente en IBS1 [SEQ ID NO. 15], COP1, PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1, M160, KCNS3, LYZ MS4A4A, HELLS, FRC4, MCM5, TAP2, LRAP, DTL, VSIG2, VSIG4 y MUC20; en particular en el grupo consistente en IBS1 [SEQ ID NO. 15], COP1, PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1, M160, KCNS3, VSIG2; más en particular en el grupo consistente en IBS1 [SEQ ID NO. 15], PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1 y VSIG2; incluso más en particular en el grupo consistente en MUC20, VSIG2 y VSIG4; más en particular el IBS1 [SEQ ID NO. 15] de IBS-MSG, proporcionará una herramienta de diagnóstico que puede añadirse a, o definir, un diagnóstico de una enfermedad, o susceptibilidad a una enfermedad, que resulte de una sub-expresión, sobre-expresión o expresión alterada espacial o temporal del gen. Los individuos portadores de mutaciones en el gen, pueden ser detectados a nivel de ADN mediante una diversidad de técnicas.

Así, se apreciará que se proporciona un método de diagnóstico de una condición patológica o una susceptibilidad a una condición patológica en un sujeto relacionada con CVH, en particular con IBS, que comprende:

- (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación en un polinucleótido, y
- (b) diagnosticar una condición patológica o susceptibilidad a una condición patológica basada en la presencia o ausencia de dicha mutación.

Los métodos incluyen además métodos de determinación de si una muestra es o no indicativa de IBS y/o de una fase particular de IBS y/o indicativa de una susceptibilidad de IBS en base a la etapa (a) descrita con anterioridad.

Los ácidos nucleicos para diagnóstico pueden ser obtenidos a partir de células del sujeto, tal como a partir de sangre (incluyendo sangre total, suero, plasma y en particular glóbulos blancos de la sangre), orina, saliva, muestra fecal, biopsia de tejido (en particular biopsia de colon) o material de autopsia. Se puede usar también ADN genómico directamente para la detección, o puede ser amplificado enzimáticamente usando PCR u otras técnicas de amplificación con anterioridad al análisis. También se puede usar mRNA o cADN de una manera similar. Los borrados e inserciones pueden ser detectados mediante un cambio de tamaño del producto amplificado en comparación con el genotipo normal. Las mutaciones puntuales pueden ser identificadas hibridizando el ADN amplificado en secuencias de nucleótido de permeasa de purina de mamífero etiquetadas. Las secuencias perfectamente emparejadas pueden ser distinguidas de las dúplex mal emparejadas mediante digestión de RNasa o mediante diferencias en las temperaturas de fusión. Las diferencias de secuencia de ADN pueden ser detectadas también mediante alteraciones en la movilidad electroforética de fragmentos de ADN en columnas o geles de electroforesis capilar, con o sin agentes desnaturizantes, o mediante secuenciación directa de ADN (por ejemplo, Myers et al., Science (1985) 230: 1242). Los cambios de secuencia en posiciones específicas pueden ser también puestos de relieve mediante endonucleasas de restricción específicas, ensayos de protección de nucleasa, tal como RNasa y protección S 1 o un método de segmentación química (véase Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 85: 4397-4401). Alternativamente, se puede construir una matriz de sondas de oligonucleótido que enlacen específicamente con los IBS-MSGs para conducir una depuración eficiente, por ejemplo mutaciones genéticas. Los métodos de tecnología de matriz son bien conocidos y tienen aplicabilidad general y pueden ser usados para direccionar una diversidad de cuestiones en genética molecular que incluyen expresión de gen, enlace genético y variabilidad genética (véase, por ejemplo: M. Chee et al., Science, Vol. 274, pp. 610-613 (1996)).

Los ensayos de diagnóstico ofrecen un proceso para diagnosticar o determinar una susceptibilidad a IBS mediante detección de mutaciones en los IBS-MGSs mediante los métodos descritos. Adicionalmente, tal enfermedad puede ser diagnosticada mediante métodos que comprenden determinar, a partir de una muestra extraída de un sujeto, un nivel anormalmente reducido o incrementado de polipéptido o de mRNA, así como determinar a partir de dichas muestras la presencia de derivados de proteína en comparación con la estructura normal. La expresión reducida o incrementada puede ser medida a nivel de ARN usando cualquiera de los métodos bien conocidos en el estado de la técnica para la cuantificación de polinucleótidos, tal como, por ejemplo, amplificación de ácido nucleico, por ejemplo mediante PCR, RT-PCR; protección de RNasa; mancha Northern y otros métodos de hibridización. Las técnicas de ensayo que pueden ser usadas para determinar los niveles de una proteína, tal como un polipéptido, en una muestra extraída de un anfitrión, son bien conocidas por los expertos en la materia. Tales métodos de ensayo incluyen radioinmunoensayos, ensayos de enlace competitivo, análisis de Mancha Western y ensayos ELISA. Las técnicas de ensayo que pueden ser usadas para determinar la presencia de derivados o variantes de proteína comprenden, entre otros, espectrografía de masas.

De ese modo, según otro aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar IBS en un sujeto, comprendiendo dicho método:

- (a) determinar, en una muestra biológica de dicho sujeto, el nivel de transcripción de gen de un IBS-MSG;
- (b) comparar el nivel de transcripción de gen con el nivel de transcripción de gen de una muestra de control normal, y
- (c) generar un diagnóstico en base al resultado de la etapa b).

Los métodos incluyen además métodos de determinación de si una muestra es o no indicativa de IBS y/o de un estado particular de IBS y/o indicativos de una susceptibilidad de IBS en base a las etapas (a) y (b) descritas en lo que antecede.

El IBS-MSG según se utiliza en los métodos de diagnóstico de la presente invención, está definido en las reivindicaciones.

En una realización particular, la muestra biológica de dicho paciente es una muestra de tejido de colon, más en particular de tejido de mucosa de colon.

Para cada una de las realizaciones descritas, la etapa (b) consiste en comparar el nivel de expresión de gen de los genes según se menciona en las reivindicaciones, con el nivel de transcripción de dichos genes en una muestra de control sana.

En cualquiera de los métodos mencionados con anterioridad para detectar y/o monitorizar IBS en un sujeto, el uso de los IBS-MGSs según se han identificado en la presente solicitud, puede ser combinado con otros genes.

Con el fin de detectar IBS en un sujeto, se podría tener que comparar los niveles de expresión de los IBS-MGSs de una muestra de dicho sujeto con una muestra de control normal. Los cambios en los niveles de expresión de los IBS-MGSs de la muestra de dicho sujeto en comparación con los niveles de expresión de dichos genes de la muestra de control, son indicativos respecto a un diagnóstico de, o con susceptibilidad a, IBS en dichos sujetos. Por ejemplo, si el nivel de cualquiera de los siguientes IBS-MGSs: IBS1 [SEQ ID NO. 15], VSI2 o MUC20 se incrementa (por ejemplo, un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 80%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150% o más), en relación a la muestra de control, esto se considera un indicador positivo de IBS en dicho sujeto. En otro ejemplo, si el nivel de cualquiera de los siguientes IBS-MGSs: COP1, PSME2, F13A1, NCF4, CSF1R, M160, KCNS3, LYZ, MS4A4A, HELLS, RFC4, MCM5, TAP2, LRAP, DTL o VSI4 se reduce (por ejemplo, un 30%, 40% 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más), con relación a la muestra de control, esto se considera un indicador positivo de IBS en dicho sujeto. Adicionalmente o alternativamente, las diferencias de expresión pueden ser expresadas como "número de veces de cambio" en comparación con el nivel de expresión observado en las muestras de control. En la presente, un cambio de 1,4 veces corresponderá a un incremento del 40%, etc. En general, una reducción en la expresión será mencionada como un cambio de 0,6 veces para una reducción de un 60%.

Según se ha descrito en lo que antecede, el nivel de transcripción de gen se determina ya sea a nivel de proteína, con preferencia usando anticuerpos que enlazan con el polipéptido de IBS-MSG, o ya sea a nivel de transcripción de gen, con preferencia usando sondas que enlazan específicamente con un oligonucleótido transcrito a partir de dicho IBS-MSG, con preferencia a nivel de cADN o de mRNA. En una realización particular, el nivel de transcripción de gen se determina usando tecnología de matriz, a nivel de oligonucleótido usando sondas específicas según se ha descrito en lo que antecede.

Por ello, en una realización adicional de la presente invención, el nivel de expresión de gen en los métodos mencionados anteriormente se evalúa usando una sonda que enlaza específicamente con el cADN o mRNA del gen de interés; en particular, usando tecnología de micro-matriz.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención consiste en proporcionar un método para determinar y

monitorizar IBS en un sujeto, en el que el nivel de transcripción de gen se evalúa usando una matriz de sondas de oligonucleótido que enlazan con los IBS-MSGs según se reivindica. Tal y como se ha mencionado con anterioridad, las matrices de sondas de oligonucleótido para los IBS-MSGs se combinan opcionalmente con sondas que enlazan específicamente con otros genes.

- 5 Las matrices de proteína son típicamente sistemas de ensayo de enlace de ligando, de fase sólida, que usan proteínas inmovilizadas sobre superficies que incluyen vidrio, membranas, pocillos de microtitulación, placas de espectrómetro de masas y perlas, u otras partículas. Los formatos automatizados multi-pocillo son los mejor desarrollados y los sistemas de depuración automatizada basados en placa de 96 pocillos son los más ampliamente utilizados. Para una descripción de matrices de proteína, véanse las Patentes US núms. 6.475.809, 6.406.921 y 10 6.197.599, y las publicaciones PCT WO 00/04389 y WO 00/07024.

- Para la construcción de matrices, las fuentes de proteína incluyen sistemas de expresión basados en célula para proteínas recombinantes, purificación a partir de fuentes naturales, producción in vitro mediante sistemas de traducción libres de células, y métodos sintéticos para péptidos. Para matrices de captura y análisis de función de proteína, es importante que las proteínas estén perfectamente dobladas y sean funcionales; éste no es siempre el caso, por ejemplo cuando se extraen proteínas recombinantes a partir de bacterias usadas bajo condiciones de desnaturalización, mientras que otros métodos (aislamiento de proteínas naturales, síntesis libre de células) conservan generalmente su funcionalidad. Sin embargo, las matrices de proteínas desnaturalizadas son útiles en anticuerpos de depuración para actividad cruzada, identificación de anticuerpos y selección de proteínas de enlace de ligando.

- 20 El método de inmovilización usado debe ser reproducible, aplicable a proteínas de diferentes propiedades (tamaño, hidrofílicas, hidrofóbicas), susceptible de alto rendimiento y grado de automatización, y compatible con la conservación de la actividad completa de la proteína funcional. Se utilizan ambos métodos covalente y no covalente de inmovilización de proteína. Los sustratos para la unión covalente incluyen platinas de vidrio recubiertas de reactivos de silano que contienen amino o aldehído (Telechem). En el sistema de Versalinx (Prolinx), se logra un acoplamiento covalente reversible mediante interacción entre la proteína derivatizada con ácido borónico, y ácido salicilhidroxámico inmovilizado sobre la superficie de soporte. Los métodos de acoplamiento covalente que proporcionan un enlace estable pueden ser aplicados a una gama de proteínas. El enlace no covalente de proteína no modificada ocurre dentro de estructuras porosas tales como HydroGel (Perkin Elmer), en base a gel de poliacrilamina de 3 dimensiones.

- 30 Se describe un método para identificar y/o monitorizar IBS en un sujeto, que comprende:
- a) determinar, en una muestra biológica de dicho sujeto, el nivel de proteína de al menos una proteína de IBS-MSG;
 - b) comparar el nivel de proteína con el nivel de proteína de una muestra de control normal, y
 - c) generar un diagnóstico en base al resultado de la etapa (b).

- 35 Con preferencia, el nivel de proteína se determina usando al menos un anticuerpo que enlace con una proteína de IBS-MSG. En particular, usando uno o más anticuerpos, cada uno de los cuales enlaza con un polipéptido codificado mediante un IBS-MSG seleccionado entre IBS1 [SEQ ID NO. 15], COP1, PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1, M160, KCNS3, LYZ, MS4A4A, HELLS, FRC4, MCM5, TAP2, LRAP, DTL, VSIG2, VSIG4 y MUC20; en particular, en el grupo consistente en IBS1 [SEQ ID NO. 15], COP1, PSME2, F13A1, NCF4, CSF1R, M160, KCNS3, VSIG2; más en particular en el grupo consistente en IBS1 [SEQ ID NO. 15], PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1 y VSIG2; incluso más en particular en el grupo consistente en MUC20, VSIG2 y VSIG4; en un ejemplo específico, el nivel de proteína se determina usando un anticuerpo específico para IBS1 [SEQ IS NO. 15].

- En una versión alternativa, el método no está limitado a al menos una proteína, sino que requiere la evaluación simultánea de los niveles de expresión del grupo de proteínas identificadas como involucradas en IBS. La evaluación simultánea de los niveles de expresión del grupo de proteínas puede hacerse usando tecnología de matriz, en particular usando métodos inmunológicos (tal como ELISAs y RIAs). Según se ha mencionado con anterioridad, el agente primario en matrices de proteína, típicamente un anticuerpo o una proteína que reconoce las proteínas de IBS, está enlazado a un soporte sólido (por ejemplo, una membrana o una placa de microtitulación). Usando este soporte sólido, las proteínas de IBS pueden ser extraídas a partir de la muestra biológica y cuantificadas usando un agente secundario (por ejemplo, un segundo anticuerpo que reconozca un segundo epítipo en la proteína de IBS, o un anticuerpo o una proteína que reconozca el anticuerpo primario), conjugado con una etiqueta detectable tal como una enzima, con preferencia peroxidasa de rábano picante, o un isótopo radiactivo tal como ¹²⁵I.

Se proporcionan métodos para detectar y/o monitorizar IBS en un sujeto, comprendiendo dichos métodos:

- 55 a) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto con un agente que enlaza específicamente con un polipéptido de IBS-MSG;
- b) determinar el nivel de enlace del agente con el polipéptido;

- c) comparar el nivel de enlace del agente de dicha muestra biológica con el nivel de enlace del agente de una muestra de control normal, y
- d) generar un diagnóstico o determinar si la muestra es o no indicativa de IBS y/o de un estado particular de IBS basándose en el resultado de la etapa c).

5 Según ha sido ya mencionado con anterioridad, se describe un ensayo que utiliza una matriz de proteína de anticuerpos específicos de polipéptido de IBS-MSG; en una muestra, los dos o más anticuerpos específicos son cada uno de ellos reactivo con polipéptidos de IBS-MSGs seleccionados en el grupo consistente en IBS1 [SEQ ID NO. 15], COP1, PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1, M160, KCNS3, LYZ, MS4A4A, HELLS, FRC4, MCM5, TAP2, LRAP, DTL, VSIG2, VSIG4 y MUC20; en particular, reactivo con polipéptidos de IBS-MSGs seleccionados en el grupo

10 consistente en IBS1 [SEQ ID NO. 15], COP1, PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1, M160, KCNS3 y VSIG2; más en particular, reactivo con polipéptidos de IBS-MSGs seleccionados en el grupo consistente en IBS1 [SEQ ID NO. 15], PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1 y VSIG2; incluso más en particular, reactivo con IBS-MSGs seleccionados en el grupo consistente en MUC20, VSIG2 y VSIG4. Según se ha mencionado con anterioridad, las matrices de proteína para los IBS-MSGs se combinan opcionalmente con agentes que enlazan específicamente con otros genes, en

15 particular seleccionados en el grupo consistente en CASP1, FCGR2A y CKB.

A efectos de detectar IBS en un sujeto, se podría tener que comparar el nivel de enlace del agente a los polipéptidos de IBS-MSG en una muestra de dicho sujeto con el nivel de enlace en una muestra de control normal. Los cambios en los niveles de enlace son indicativos para un diagnóstico de, o susceptibilidad a, IBS en dicho sujeto. Por ejemplo, si se incrementa el nivel de enlace de cualquiera de los siguientes polipéptidos de IBS-MSG: IBS1 [SEQ ID

20 NO. 15], VSIG2 o MUC20 (por ejemplo, un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150% o más) en relación con la muestra de control, esto se considera un indicador positivo de IBS en dicho sujeto. En otro ejemplo, si se reduce el nivel de enlace de cualquiera de los siguientes polipéptidos de IBS-MSG: COP1, PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1, M160, KCNS3, LYZ, MS4A4A, HELLS, RFC4, MCM5, TAP2, DTL o VSIG4 (por ejemplo, un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más) en relación con la muestra de control, esto se

25 considera un indicador positivo de IBS en dicho sujeto.

Los métodos de diagnóstico descritos en la presente memoria pueden ser usados también para monitorizar el IBS en un sujeto o determinar las dosificaciones de compuestos terapéuticos. En un ejemplo, se administra un compuesto terapéutico y el nivel de expresión de IBS-MSG se determina en el transcurso de la terapia.

Los productos terapéuticos que modulan la expresión de uno cualquiera o más de los IBS-MSGs, se consideran particularmente útiles. En un ejemplo, un agente terapéutico que disminuye en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150% o más, el nivel de expresión de gen de cualquiera de los siguientes IBS-MSGs: IBS1 [SEQ ID NO. 15], VSIG2, o MUC 20 durante el transcurso de la terapia, se considera que es un agente terapéutico efectivo o una dosis efectiva de un agente terapéutico. En otro ejemplo, un agente

30 terapéutico que incrementa un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más el nivel de expresión de cualquiera de los siguientes IBS-MSGs: COP1, PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1, M160, KCNS3, LYZ, MS4A4A, HELLS, RFC4, MCM5, TAP2, LRAP, DTL o VSIG4 durante el transcurso de la terapia, se considera que es un

35 agente terapéutico efectivo o una dosis efectiva de un agente terapéutico.

Kits de diagnóstico

La invención abarca también kits para detectar la presencia de un producto de IBS-MSG en una muestra biológica, comprendiendo el kit los componentes requeridos para llevar a cabo los ensayos de diagnóstico reivindicados, e instrucciones para el uso de los componentes a efectos de evaluación de la expresión de los IBS-MSGs en una muestra biológica y de diagnóstico de IBS en un sujeto.

40

Por consiguiente, un objeto de la presente invención consiste en proporcionar un kit de diagnóstico según se reivindica:

45 Los kits de diagnóstico incluyen en general una etiqueta o instrucciones en cuanto al uso previsto de los componentes del kit, y una muestra de referencia para ser usada con el fin de establecer una curva estándar. En un ejemplo, el kit contiene instrucciones para la utilización del kit en el diagnóstico de IBS. En otro ejemplo más, el kit contiene instrucciones para el uso del kit en la monitorización del tratamiento terapéutico o de regímenes de dosificación para el tratamiento de IBS. Se comprenderá que los valores de

50 la muestra de referencia dependerán del uso previsto del kit. Por ejemplo, la muestra puede ser comparada con un valor de referencia normal, en el que una alteración de los niveles de uno o más polipéptidos, o de una métrica que utilice los niveles de uno o más de los polipéptidos, es indicativa de IBS, o de predisposición a IBS. En otro ejemplo, un kit usado para monitorización terapéutica puede tener un valor de referencia que sea indicativo de IBS, en el que una alteración en el nivel de uno más de los polipéptidos o de una métrica que utilice niveles de uno o más de los polipéptidos en relación con la muestra de

55 referencia, puede ser usada para indicar la eficacia terapéutica o las dosificaciones eficaces de compuestos terapéuticos.

Utilidad terapéutica

La presente descripción materializa métodos y composiciones para tratar o prevenir CVH, en particular para tratar o prevenir IBS en un sujeto. Se ha descubierto que los niveles de IBS1 [SEQ ID NO. 15], VSIG2 y MUC20 se incrementan en sujetos que tienen IBS. Por lo tanto, esto incluye métodos y agentes que reducen los niveles de expresión o la actividad biológica de uno cualquiera o más de estos polipéptidos o moléculas de ácido nucleico.

5 Tales agentes, que se describen con mayor detalle en lo que sigue, incluyen compuestos que sub-regulan o inhiben la actividad biológica de uno cualquiera o más de los anteriores polipéptidos; formulaciones inmunológicas/de vacuna; un anticuerpo purificado o un fragmento de enlace de antígeno que enlaza específicamente uno cualquiera de los anteriores polipéptidos; oligómeros de nucleobasa antisentido; y dsARNs que objetivan cualquiera de los polipéptidos anteriores.

10 En un aspecto, la reducción de la actividad biológica de los polipéptidos que están sobre-regulados en IBS, será establecida con la utilización de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista, por ejemplo un péptido o compuesto de molécula pequeña, en combinación con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 Esta invención podrá ser mejor comprendida mediante referencia a los Detalles Experimentales que siguen, pero los expertos en la materia podrán apreciar fácilmente que éstos son ilustrativos de la invención según se describe de manera más completa en las reivindicaciones que siguen a continuación. Adicionalmente, a través de la presente solicitud, se citan varias publicaciones. La descripción de estas publicaciones queda incorporada por referencia en la presente solicitud, para describir de forma más completa el estado de la técnica al que pertenece la presente invención.

20 **Procedimientos Experimentales**

Para comprender mejor los mecanismos moleculares presentes en la patogénesis de IBS, se realizó un estudio de perfil de expresión de micro-matriz de la mucosa de colon sigmoidea, usando biopsias que fueron recogidas de la misma manera que en la práctica clínica rutinaria.

Según se explica con mayor detalle en lo que sigue, nuestro estudio incluyó 36 pacientes de IBS (21 IBS-D y 15 IBS-C) y 25 sujetos de control sanos. Todos los pacientes cumplían los criterios Roma II para diagnóstico de IBS (Thompson et al., 1999) y se sometieron a examen clínico completo para excluir otros desórdenes gastrointestinales. Los pacientes fueron seleccionados en base a su disfunción intestinal predominante que fue confirmada en el momento del estudio por medio de un cuestionario estándar. Se recogieron dos biopsias de colon sigmoideas a partir de cada participante durante un examen de sigmoidoscopia. Una tercera biopsia de colon adicional fue
 30 recogida 2-3 meses después en 10 sujetos (5 pacientes de IBS y 5 controles sanos) con el fin de evaluar la estabilidad de las firmas moleculares en los sanos y en los de IBS.

Métodos

Reclutamiento de sujetos y recogida de muestras de biopsia de colon

Los participantes de IBS fueron seleccionados en una base de datos administrativa de 752 pacientes con IBS
 35 residentes dentro de un radio de 150 millas desde Rochester (Minnesota, U.S.A.), y fueron reclutados por correo. Todos los pacientes de IBS habían sido ya evaluados por un gastroenterólogo de la plantilla, mediante pruebas clínicamente indicadas que incluyen endoscopias, biopsias y pruebas de evacuación rectal. Los pacientes fueron seleccionados en base a su disfunción intestinal predominante, la cual fue confirmada en el momento de estudio por medio de un cuestionario estándar (Talley et al., 1990). Los voluntarios sanos fueron reclutados mediante anuncios públicos en Rochester, MN. Todos los participantes que respondieron a una carta que les invitaba a su participación, firmaron un consentimiento informado para el estudio, el cual fue aprobado por la Mayo Clinic Institutional Review Board. Cada participante rellenó un cuestionario validado de enfermedad de intestino (Talley et al., 1990) que incluía
 40 cuestiones que corresponden a los criterios Roma II (Thompson et al., 1999). El cuestionario de enfermedad de intestino incluye también una relación de síntomas sicosomáticos previstos para identificar desórdenes y síntomas de somatización que caractericen dispepsia no ulcerosa, y ha sido usado ampliamente en estudios de epidemiología.

Los participantes acudieron al Centro de Investigación Clínica General en Charlton 7, para someterse a sigmoidoscopia flexible para la recogida de biopsias colónicas. Debido al riesgo de sangrando a consecuencia del procedimiento de biopsia, los participantes que tomaban aspirina o anticoagulantes fueron excluidos si estas medicaciones no podían ser interrumpidas al menos 1 semana antes de la endoscopia. Dos enemas de fosfosoda (enema Fleet®, C.B. Fleet, Lynchburg, VA) fueron administrados una hora antes de la sigmoidoscopia. Las biopsias fueron tomadas a partir de mucosa aparentemente normal solamente, es decir, se evitaron las áreas con edema debido a presión de endoscopia. La sigmoidoscopia fue realizada sin sedación según el estándar clínico de la Clínica Mayo, y los sujetos fueron monitorizados durante 60 minutos después de las biopsias para asegurar que se encontraban estables sin signos de sangrado alguno o de otras complicaciones. Usando fórceps de biopsia de
 50 tamaño grande estándar, se recogieron dos biopsias de mucosa de colon sigmoidea a partir de 15 pacientes de IBS-C y 21 de IBS-D, y de 25 controles sanos. Diez de estos sujetos (5 controles y 5 pacientes de IBS) fueron seleccionados aleatoriamente para tener una segunda sigmoidoscopia aprobada de IRB, 2-3 meses después de la primera recogida con el fin de evaluar la reproducibilidad de datos.

Procesamiento de matriz y pre-procesamiento de los datos

Tras la recogida, las muestras de biopsia de colon fueron sumergidas inmediatamente en 5 volúmenes de solución de ARN (Ambion, Austin, TX) y almacenadas a -20 °C hasta su posterior análisis. El tejido fue homogeneizado en una amasadora mezcladora 501 (Qiagen, Venlo, Holanda) en solución de lisis de célula RLT (Qiagen), seguido de extracción de ARN a partir de las células rotas usando el mini kit RNeasy (Qiagen) con tratamiento DNasa en la columna. Un µg del ARN total era biotina etiquetada e hibridizada sobre micro-matrices de Genoma Humano U133 Plus 2.0 GeneChip, de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Affymetrix, Santa Clara, CA). Dado el gran número de muestras (n = 132), este procesamiento se llevó a cabo en el laboratorio en 4 lotes diferentes, cada uno de los cuales comprendía muestras tanto de sujetos con IBS como sanos. Los valores de sumario de expresión de gen para los datos de Affymetrix GeneChip en bruto, fueron computados utilizando el algoritmo gcRMA (Wu et al., 2004), el cual realiza ajuste de fondo, normalización y sumarización cuantil, teniendo en cuenta las afinidades de GC. Se usó PANP (Warren et al., 2006) para activar la detección de genes ausentes o presentes, y los genes fueron filtrados cuando se encontraron presentes en al menos el 50% de las muestras de un grupo de tratamiento (McClintick y Edenberg, 2006). Un efecto de los diferentes lotes de procesamiento de muestra se mantuvo evidente tras la normalización. La fuente de variación técnica fue corregida en cuanto a modelación de los niveles de expresión en función del lote de origen en un ANOVA de un sentido, y usando los residuos de este modelo para todos los análisis posteriores. Finalmente, para evitar resultados engañosos debido a la pseudo-replicación (Hurlbert 1984), los valores de expresión de las muestras replicadas fueron promediados por paciente en cuanto a los análisis SAM y PAM (véase lo que sigue).

Evaluación de concordancia de mediciones repetidas

Para cuantificar la reproducibilidad de la muestra en el tiempo y el espacio para el mismo paciente, se calcularon coeficientes de concordancia (Lin 1989) para las 1000 sondas de gen más variables, así como para el conjunto de 32 sondas de gen que se encontró que eran predictivas en cuanto a estado de enfermedad de IBS en el análisis PAM.

Comprobación respecto a genes expresados diferencialmente

El análisis de significación de micro-matrices (SAM) fue aplicado para identificar genes expresados diferencialmente en personas enfermas de IBS frente a personas sanas, usando un D de 0,05 (Tusher et al.). Un modelo estadístico alternativo, más riguroso, fue aplicado también sobre los datos en bruto (es decir, los datos pre-procesados de muestras de biopsia con anterioridad a la corrección del lote), por aplicación de ANOVA mixto con lote y estado de enfermedad como efecto fijo y con el paciente como efecto aleatorio, y con corrección FDR (Storey et al., 2003).

Clasificación

Para la predicción de estado de enfermedad, se aplicó Análisis Predictivo de Micro-matrices (PAM), el cual es una variante potenciada de clasificación de centroide más próxima que utiliza centroides contraídos (Tibshirani et al., 2002). Muestras de 8 pacientes de IBS y de 8 sujetos sanos, fueron conservadas independientes a partir de la etapa de construcción del modelo para evaluar el poder predictivo del modelo en cuanto a comprobación para un posible sobreajuste.

Agrupación jerárquica

Para identificar una estructura subyacente en las firmas moleculares, se aplicó agrupación jerárquica (software Spotfire DecisionSite 8.2) sobre un conjunto de 16 sondas de gen que fueron seleccionadas tanto en análisis PAM como SAM

URLs

El software SAN está disponible en <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>.

El software PANP está disponible en <http://people.brandeis.edu/~dtaylor/PANP/>.

Resultados y discusión

Análisis de muestra

El ARN total de biotina etiquetada preparado a partir de cada una de las muestras de biopsia de colon, fue hibridizado sobre micro-matrices de Genoma Humano U133 Plus 2.0 GeneChip (Affymetrix). El pre-procesamiento de los archivos de datos en bruto generados, incluyendo ajuste de fondo, normalización y transformación de datos y corrección en cuanto a variación técnica de lote, reveló perfiles de valores de sumario de expresión de gen para cada muestra que fueron usados en todos los análisis adicionales.

Un requisito previo para cualquier biomarcador útil es la reproducibilidad de los perfiles de expresión de gen en sujetos individuales. Se midió el coeficiente de concordancia, que mide lo bien que un conjunto de puntos se empareja con la línea de identidad (Lin 1989), entre muestras repetidas del mismo paciente utilizando las 1.000

sondas de gen más variables en la micro-matriz. Tanto la concordancia entre dos muestras recogidas simultáneamente ($0,7 \pm 0,03$), como entre dos muestras recogidas en la misma persona pero con un intervalo de tiempo de 3 meses ($0,41 \pm 0,03$), excedieron significativamente la concordancia global ($0,25 \pm 0,12$; prueba de Mann-Whitney U; respectivamente, $W=3510$, $p<0,0001$ y $W=6744$, $p<0,0001$). No se observaron diferencias significativas algunas en los valores de concordancia entre pacientes de IBS y los controles sanos (Figura 1A). Puesto que los perfiles de expresión global de biopsias de colon sigmoideas fueron relativamente estables para las recogidas de muestras de dos sitios y dos momentos, los niveles de expresión de sonda de gen de las dos muestras de colon recogidas por paciente fueron promediados para análisis posteriores como análisis de significación de micro-matriz (SAM) y de clasificación (véase lo que sigue). Además, la selección del subgrupo para la recogida de muestra repetida fue representativa del grupo de estudio original. Esto fue evaluado seleccionando aleatoriamente 10 individuos para la recogida repetida de muestra: 5 controles sanos y 5 pacientes de IBS, sin consideración de ningún criterio de selección. A posteriori, se verificó si este subgrupo de sujetos era representativo en cuanto al grupo total usando análisis de mapa espectral. La salida gráfica de este análisis, que resume el efecto combinado de los seis primeros componentes principales, muestra que los sujetos seleccionados para toma de muestras repetidas son, en efecto, representativos del grupo completo (Figura 2).

A continuación, se realizó una investigación en cuanto a genes expresados diferencialmente entre pacientes de IBS y controles sanos, usando el algoritmo SAM (Tusher et al., 2001). A una tasa de falso descubrimiento de un 5%, se encontró que 25 conjuntos de sonda de gen estaban expresados diferencialmente entre personas de IBS y personas sanas a un nivel de significación de 0,1 para los q valores. Estos 25 conjuntos de sonda de gen significativos ($q<0,1$) representaban 20 genes diferentes; 4 sobre-regulados y 16 sub-regulados en pacientes de IBS en comparación con controles sanos (Tabla 1). Una aproximación estadística alternativa fue aplicada también sobre los datos en bruto normalizados. Esto fue un modelo ANOVA mixto, con lote y estado de enfermedad como efecto fijo y con paciente como efecto aleatorio, y con corrección de falsa tasa de descubrimiento (Storey et al., 2003). Los análisis dieron como resultado una lista de genes muy similar con valores q comparables al análisis SAM (Tabla 1). Los genes que fueron expresados diferencialmente de manera significativa, reflejaron cambios muy finos en los niveles de expresión: solamente unos pocos de los genes significativos tuvieron cambios en el nivel de expresión $> 1,5$ veces entre los pacientes de IBS y los controles sanos.

Tabla 1

Conjunto de sonda	Símbolo de gen	Valor q SAM	Valor q ANOVA	Veces de cambio	Anotación de gen
Expresión MÁS ALTA en pacientes de IBS frente a controles					
225809_at	<i>IBS1</i>	0,018	0,03	1,41	DKFZP564O0823 (IBS1)
204687_at	<i>IBS1</i>	0,018	0,01	1,24	DKFZP564O0823 (IBS1)
226622_at	<i>MUC20</i>	0,018	0,05	1,52	Mucin 20
229369_at	<i>VSIG2</i>	0,023	0,01	1,20	V-set y dominio de inmunoglobulina que contiene, 2
231941_s_at	<i>MUC20</i>	0,030	0,07	1,47	Mucina 20
200884_at	<i>CKB</i>	0,039	0,05	1,29	Creatina kinasa, cerebro
Expresión MÁS BAJA en pacientes de IBS frente a controles					
223655_at	<i>M160</i>	0,018	0,05	0,69	Proteína M160 de tipo 1 rica en cisteína de receptor limpiador (antígeno de CD 163 de tipo 1)
294787_at	<i>VSIG4</i>	0,023	0,05	0,66	V-set y dominio de inmunoglobulina que contiene, 4
211368_s_at	<i>CASP1</i>	0,030	0,05	0,75	Caspasa 1, peptidasa de cisteína relacionada con apoptosis (interleuquina 1, beta, convertasa)
205147_x_at	<i>NCF4</i>	0,030	0,05	0,70	Factor citosólico neutrofilo 4,40 kDa
1555745_a_at	<i>LYZ</i>	0,030	0,11	0,48	Lisozima
205968_at	<i>KCNS3</i>	0,039	0,10	0,66	Canal con puerta de tensión de potasio, rectificador retardado, subfamilia S, miembro 3
211367_s_at	<i>CASP1</i>	0,039	0,06	0,75	Caspasa 1, peptidasa de cisteína relacionada con apoptosis

201762_s_at	<i>PSME2</i>	0,045	0,01	0,84	(interleukina 1, beta, convertasa) Subunidad 2 activadora d proteasoma (PA28 beta)
211366_x_at	<i>CASP1</i>	0,049	0,08	0,76	Caspasa 1, peptidasa de cisteína relacionada con apoptosis (interleukina 1, beta, convertasa)
219607_s_at	<i>MS4A4A</i>	0,056	0,13	0,74	Membrana que abarca 4 dominios, subfamilia A, miembro 4
220085	<i>HELLS</i>	0,058	0,07	0,82	Helicasa, específica de linfocito
1552703_s_a	<i>COP1</i>	0,080	0,06	0,81	Seudo-ICE inhibidor negativo dominante de caspasa 1
203561_1t	<i>FCGR2A</i>	0,080	0,08	0,77	Fragmento Fc de IgG, Ila de baja afinidad, receptor (CD32)
204023_at	<i>RFC4</i>	0,084	0,06	0,83	Factor C de replicación (activador) 4,37 kDa
206011_at	<i>CASP1</i>	0,084	0,11	0,77	Caspasa 1, peptidasa de cisteína relacionada con apoptosis (interleukina 1, beta, convertasa)
216237_s_at	<i>MCM5</i>	0,084	0,08	0,76	MCM5 mantenimiento deficiente de minicromosoma 5, ciclo de división celular 46 (S. cerevisiae)
225973_at	<i>TAP2</i>	0,084	0,16	0,71	Transportador 2, casete de enlace ATP, subfamilia B (MDR/TAP)
219759_at	<i>LRAP</i>	0,084	0,21	0,39	Amino peptidasa de arginina derivada de leucocito
218585_s_at	<i>DTL</i>	0,084	0,11	0,79	Homólogo sin dentículo (Drosophila)

Es importante observar que la mayor parte de los 20 genes significativos identificados juegan un papel en la respuesta inmune del sistema de defensa anfitrión contra la invasión microbiana. Una visión general esquemática de los genes expresados diferencialmente en colon mucosal de pacientes de IBS frente a controles sanos, ha sido proporcionada en la Figura 3. Los diagramas de los niveles de expresión de algunos de los genes significativos con expresión diferencial entre personas enfermas de IBS y personas sanas, han sido mostrados en la Figura 4.

Alteraciones en genes que afectan al procesamiento de antígeno

Al menos tres genes con niveles de expresión significativamente más bajos en la mucosa colónica de pacientes de IBS, juegan un papel esencial en la ruta de procesamiento y presentación de antígeno mediante el complejo principal de histocompatibilidad I: *PSME2* (subunidad 2 activadora de proteasoma, PA28 beta), *TAP2* (transportador 2, casete de enlace de ATP, subfamilia B), y *LRAP* amino peptidasa de arginina derivada de leucocito). La PA28 es esencial en el conjunto de complejo de inmunoproteasoma citosólica, que es responsable del procesamiento de antígeno de los péptidos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I (Preckel, et al., 1999). *TAP2* forma, junto con *TAP1*, un transportador de casete de enlace de ATP (ABC) de transmembrana heterodimérica en la membrana de retículo endoplásmico (ER) que es esencial para el suministro de péptidos antigénicos a partir del citosol en el ER, donde estos péptidos son cargados en las moléculas de MHC de clase I. *TAP2*, a diferencia con *TAP1*, es muy inestable en aislamiento, y la biogénesis de *TAP* funcional depende del conjunto de *TP1* preexistente con *TAP2* recién sintetizado, pero no al contrario, lo que sugiere que la expresión de *TAP2* principalmente regula el número de moléculas transportadoras activas (Keusekotten et al., 2006). En el ER, las moléculas de MHC de clase I se basan en amino peptidasas para adaptar precursores a péptidos antigénicos. *LRAP*, también denominado amino peptidasa 2 de ER (ERAP2), es una de las enzimas clave responsable de la hidrólisis de aminoácidos de terminal N de proteínas o de sustratos de péptido (Saveanu et al., 2005). En conjunto, los niveles de expresión significativamente más bajos de *PSME2*, *TAP2* y *LRAP* en la mucosa de colon de los pacientes de IBS, sugiere considerablemente que la actividad funcional en la presentación de antígeno de MHC de clase I está modulada en estos pacientes.

Alteraciones en genes que controlan respuesta inmune

Adicionalmente, otros 6 genes significativamente alterados en nuestro estudio están implicados en la respuesta

inmune: *VSIG4*, *FCGR2A*, *NS4A4Am* *M160* y *MUC20* (véase tabla 1 para valores q respectivos). La expresión de *VSIG4*, un miembro de la familia de proteínas de V-set y dominio de inmunoglobulina que contiene (VSIG), se redujo, mientras que la expresión de otro miembro de la familia cercanamente relacionado, el *VSIG2*, es más alta en la mucosa del colon de estos sujetos. La significación de la alteración simultánea pero opuesta en la expresión de gen de *VSIG4* y *VSIG2* en pacientes de IBS, es altamente interesante dados los recientes descubrimientos sobre la función de estos genes. El papel funcional de todos los miembros de la familia VSIG no ha sido aún bien estudiada, pero el *VSIG4* parece ser crítico en la regulación de una respuesta inmune mediada por fagocitosis y/o presentación de antígeno (Kim et al., 2005). Otra alteración de gen significativa que proporciona evidencia adicional para un sistema de respuesta inmune modulada en el colon de los pacientes de IBS es *FCGR2A* (CD32), que codifica el receptor Fc de inmunoglobulina. Estos receptores son esenciales en la protección del organismo frente a antígenos al eliminar complejos de antígeno-anticuerpo de la circulación. Los receptores de Fc están presentes en monocitos, macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales (NK), y linfocitos T y B, y participan en fagocitosis de complejos inmunes y en modulación de producción de anticuerpos por células B (Unkeless JC, 1989). La expresión de *MS4A4A* y de molécula CD163 de tipo 1 (*M160*), es también más baja en pacientes de UBS. *MS4A4A* es una subunidad homóloga de otro receptor de inmunoglobulina, y la molécula CD163 de tipo 1 (*M160*) es un miembro anclado en membrana de la superfamilia rica en cisteína de receptor limpiador que se expresa principalmente en células asociadas al sistema inmune.

Alteraciones en genes involucrados en mecanismos de defensa local

La expresión de la superficie celular asociada a la proteína mucina 20 (codificada por *MUC20*), por otra parte, es elevada en pacientes de IBS. Se sabe que este gen se expresa predominantemente en el riñón, y ha sido descrita una expresión elevada en células epiteliales a partir de túbulos renales proximales en pacientes de nefropatía de IgA así como en modelos de daños renales severos (Higuchi et al., 2004). Además, la estimulación de una línea de células epiteliales tubulares renales con sustancias pro-inflamatorias tales como lipopolisacárido (LPS), forbol 12-miristato 13 acetato (PMA) o factor alfa de necrosis tumoral, incrementa significativamente la expresión de mRNA de *MUC20*. La elevada expresión de *MUC20* encontrada en la mucosa colónica de pacientes de IBS podría reflejar una respuesta a un daño o inflamación local.

Alteraciones en genes involucrados en la respuesta de defensa del anfitrión a patógenos

Al menos 4 de los genes expresados diferencialmente (*LYZ*, *CARP1*, *COP1*, *NCF4*) (Tabla 1) están involucrados en la respuesta de defensa del anfitrión frente a los patógenos del colon. El nivel de expresión de lisozima de agente antimicrobiano (*LYZ*), cuyo sustrato natural es el peptidoglicano de pared de célula bacteriana, es significativamente más bajo en pacientes de IBS, lo que sugiere que pueden existir las bases biológicas para una inmunidad innata comprometida en el colon de los pacientes de IBS; esta función requiere estudio adicional. Las células de Paneth son células epiteliales secretoras de la mucosa de intestino delgado, y una fuente principal de péptidos antimicrobianos que incluyen lisozima. Estas defensas antimicrobianas pueden ser también reclutadas en sitios de inflamación del colon a través de metaplasia de células de Paneth, más probablemente como un mecanismo de respuesta de inmunidad innata de la mucosa (Wehkamp et al., 2006). Si el sistema inmune innato de la mucosa del colon está afectado en pacientes de IBS, ello requerirá un estudio adicional. Las citoquinas pro-inflamatorias, tal como la interleukina-1 β (IL-1 β) y el interferón gamma (IFN- γ), son componentes importantes del sistema de defensa antimicrobiano. La IL-18 es un factor de estimulación de IFN- γ , y juega un importante papel en la defensa frente a una diversidad de patógenos bacterianos gram-positivos y negativos. La síntesis de IL-1 β depende de la segmentación proteolítica de sus proteínas precursoras (pro IL-1 β y pro IL-18) por parte de la caspasa 1 (CASP1) de proteasa de cisteína, también conocida como enzima convertidora de interleukina-1 β (IL-1 β). Los ratones con deficiencia de caspasa-1 tienen un defecto principal en cuanto a la producción de IL-18 y en IL-1 β in vivo, y esto va acompañado de una resistencia a dosis letales de endotoxina/LPS (Li et al., 1995). Estos ratones son también de dos a tres veces más susceptibles a infección letal de *Escherichia coli* que los ratones salvajes debido a un fallo en el mecanismo de defensa innata del anfitrión (Joshi et al., 2002). El inhibidor negativo dominante de caspasa-1 (COP1), conocido también como pseudo-ICE, interactúa físicamente con la caspasa-1 para bloquear su activación, y con ello, la secreción de IL-1 β e IL-18.

La expresión tanto de CASP1 como de COP1 se reduce en el colon mucosal de los pacientes de IBS. Los genes para CASP1 y COP1 son contiguos en el cromosoma 11q, y se ha sugerido que ambos genes están bajo regulación transcripcional similar, en base a su distribución de tejido idéntica (Druilhe et al., 2001). Los efectos de la expresión de mRNA alterado de CASP1 y COP1 sobre el nivel de expresión de proteína y posteriormente sobre la producción de IL-1 β e IL-18 son, sin embargo, desconocidos. En las muestras de nuestra población de estudio, el IL-10 no fue expresado diferencialmente, sino que se ha informado de una expresión incrementada de mRNA de mucosa rectal recientemente en pacientes de IBS post-infeccioso adquirido (Gwee et al., 2003).

El complejo de oxidasa de NADPH fue originalmente identificado y caracterizado en fagocitos, donde juega un papel esencial en la defensa no específica del anfitrión frente a organismos microbianos, catalizando la generación de un aumento brusco de superóxido a partir del oxígeno y de NADPH. La estructura de NADPH oxidasa consiste en 2 elementos enlazados a membrana (gp91^{phox} y p22^{phox}, codificados por *CYBB* y *CYBA*, respectivamente), tres componentes citosólicos (p67^{phox}, p47^{phox} y p40^{phox}, codificados por *NCF2*, *NCF1* y *NCF4*), y una proteína de bajo

peso molecular G (ya sea *rac1* o bien *rac2*, codificadas por *RAC1* y *RAC2*). La activación del complejo de enzima está asociada a la migración de los componentes citosólicos hasta la membrana de célula, de modo que pueda ser ensamblada la oxidasa completa (DeCoursey y Ligeti, 2005). La expresión más baja de *NCF1* y *NCF4* en el colon mucosal de pacientes de IBS, puede provocar así un acortamiento de componentes citosólicos transportados hasta los elementos enlazados a membrana del complejo de enzima de oxidasa NADPH, que conduce a una actividad disminuida de oxidasa de NADPH expresada por fagocito. El núcleo catalítico esencial de la oxidasa, gp91^{phox} (denominada también actualmente Nox2), pertenece a una familia de varias oxidasas muy similares. Se identificaron homólogos de la NADPH oxidasa en numerosos tipos de células no fagocíticas, incluyendo el complejo de enzima Nox1 que es expresado predominantemente en células epiteliales de mucosa superficial del colon (Kikuchi et al., 2000). Los diferentes homólogos de complejo de enzima pueden ser distinguidos a nivel molecular en base a su composición de subunidades. En comparación con el complejo Nox2 que se expresa en los fagocitos, el complejo Nox1 comparte la subunidad p22^{phox} (CYBA), pero las subunidades gp99^{phox} (CYBB), p47^{phox} (NCF1), y p40^{phox} (NCF4) están cambiadas por *NOX1*, *NOXO1* y *NOXA1*, respectivamente. De forma interesante, se encontró una expresión elevada incierta de *NOX1* en la mucosa colónica de al menos un subconjunto de pacientes de IBS para varios conjuntos de sonda *NOX1* de la micro-matriz (206418_at; 207217_s_at; 210808_s_at). Se ha demostrado que las células epiteliales de colon humano inducen expresión Nox1 y producción sobre-regulada de superóxido en respuesta a IFN- γ (Kuwanon et al., 2006) y a flagelos de *Salmonella enteritidis* (Kawahara et al., 2004). El lipopolisacárido de *Helicobacter pylori*, que se sabe que causa una inflamación persistente y una respuesta inmune potenciada T_H1 en la mucosa gástrica humana, estimula también la expresión de mRNA de *NOX1* y *NOXO1* en células de mucosa gástrica de cerdo de guinea, seguido de una sobre-regulación de generación de superóxido (Kusumoto et al., 2005). Otro miembro de la familia de genes de oxidasa NOX/DUOX es la oxidasa 2 dual (DUOX2), que se expresa a todo lo largo del tracto digestivo, con los niveles más altos encontrados en las células epiteliales de las superficies mucosales de intestino ciego y colon sigmoideo (El Hassani et al., 2005). Se encontró que los niveles de expresión de mRNA de DUOX2 (pero no de DUOX1) se habían incrementado considerablemente en las biopsias de mucosa de colon sigmoidea de pacientes de IBS (219727_at, q = 0,15, incremento de 3,8 veces, lo que es el número de veces de cambio más grande de todos los genes). Este hallazgo podría ser algo sorprendente, puesto que se piensa que el DUOX2 es oxidasa dual expresada de modo inducible en vez de constitutivamente (al contrario que DUOX1), y puesto que DUOX2 genera una respuesta robusta, auto-limitada, durante la infección o inflamación (Harper et al., 2005). Las oxidasas duales contienen tanto un dominio de oxidasa de NADPH, responsable de la producción de H₂O₂, como un dominio de hemo peroxidasa que está relacionada muy cercanamente con varias peroxidases incluyendo la mieloperoxidasa y la lactoperoxidasa. Estas oxidasas proporcionan una fuente epitelial de especies de oxígeno reactivo (ROS) tal como superóxido y H₂O₂, los cuales tienen un papel esencial en los mecanismos de defensa del anfitrión (Geiszt et al., 2003; El Hassani et al., 2005). Los estímulos pro-inflamatorios tales como el IFN- γ inducen la expresión de DUOX2, y conducen a una producción de H₂O₂ elevada (Harper et al., 2005). Un papel directo de la oxidasa dual en la inmunidad intestinal fue demostrado en *Drosophila*: moscas adultas en las que se silenció la expresión de oxidasa mostraron un marcado incremento en la mortalidad incluso después de una infección poco importante por ingestión de una comida contaminada con microbios. Este efecto pudo ser revertido con la reintroducción de doble oxidasa, demostrando que la enzima genera un aumento brusco oxidativo epitelial único que limita la proliferación microbiana en el intestino (He et al., 2005). Se considera que la expresión elevada de DUOX2 es indicativa de la existencia de una condición inflamatoria suave aunque crónica en el colon de los pacientes de IBS. En conjunto, la expresión alterada de varios miembros de complejos de enzima multi-subunidad de oxidasa NADPH/oxidasa dual en el colon de pacientes de IBS proporciona soporte adicional para la hipótesis de que la respuesta de defensa del anfitrión frente a bacterias y otros invasores en el colon está perturbada en pacientes de IBS.

45 Sobre-regulación de un nuevo gen en Síndrome de Intestino Irritable

Finalmente, dos de los conjuntos de sonda sobre-regulada de forma más significativa en las biopsias de mucosa de colon de pacientes de IBS (Figura 5A) representan el mismo gen que aparece anotado en las bases de datos de secuencias públicas como **DKFZP564O0823** [SEQ ID No. 15] (NCBI) GenelD: 25849). Este gen se ha renombrado como **IBS1** (Síndrome de Intestino Irritable) en la presente memoria. El análisis *in silico* demuestra que la secuencia de cADN de 5 kb de *IBS1* contiene una estructura de lectura abierta de 930 bp que codifica una proteína de membrana de plasma pronosticada de 310 aminoácidos (AA), que incluye un péptido de señal (20 AA), una región extracelular (238 AA), una región transmembrana (21 AA), y una región intracelular (31 AA).

Se conoce un homólogo de ratón para el gen *IBS1* como RIKEN cADN 9130213B05, y se ha señalado además como un precursor de glicoproteína de superficie de célula. En ratas, el homólogo de *IBS1* fue identificado como un gen sobre-regulado en próstata ventral tras la castración, asociado con apoptosis, y por lo tanto se señaló como Cipar-1 (la castración indujo proteína 1 relacionada con apoptosis prostática) o PARM-1 (mensaje 1 reprimido por andrógeno prostático) (Bruyninx et al., Endocrinología, 1999, 140: 4789-4799; Comet et al., Próstata, 2003, 56: 220-230).

Aunque no se encuentra aún disponible literatura sobre el gen DKFZP564O0823 en PubMed, la Expresión de Gen Omnibus (<http://ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) comprende datos de micro-matriz experimental con expresión significativamente alterada del gen DKFZP564O0823 humano que apunta hacia un papel en cuanto a inflamación y respuesta inmune. En un primer estudio, las células endoteliales humanas primarias derivadas de diferentes tejidos

fueron intercambiadas con citoquinas inflamatorias e inmunes. La expresión de DKFZP564O0823 se incrementó en células endoteliales primarias de colon tras la exposición a $TNF\alpha$ en comparación con la exposición a $IFN\gamma$ o $IL-4$ (Figura 6A). Las dos últimas se asocian principalmente con subconjuntos de células T auxiliares, mientras que $TNF\alpha$ es una citoquina pleiotrópica con una función crítica tanto en respuestas inflamatorias como inmunológicas. Según estos datos sobre las endoteliales de colon, éstas forman solamente una parte de un gran estudio, sin que la publicación de estos experimentos incluya resultados sobre DKFZP564O0823, sino que en cambio se enfoca sobre genes bien conocidos (Sana et al., Cytokine 2005; 29: 256-269).

En un segundo estudio, la expresión de gen fue evaluada en células $CD4^+$ T de Jurkat a continuación de la inducción de la proteína Nef a partir del virus de inmunodeficiencia de simio (SIV) (Ndolo et al, Virología 2006; 353: 374-387). La proteína Nef se expresa de forma temprana en las infecciones de SIV (y de HIV), y sub-regula las moléculas de clase I complejas de histocompatibilidad principal (MHC-I) a partir de la superficie de la célula, facilitando con ello la evasión inmune. El experimento de micro-matriz pone de relieve que, entre otros muchos genes que están bien caracterizados, la expresión del gen DKFZP564O0283 está sobre-regulada por SIV-Nef (Figura 6B).

Estos dos últimos estudios están en la literatura conceptualmente en línea con nuestros resultados que también apuntan hacia alteraciones en la respuesta inmune en el colon de pacientes de IBS en comparación con lo controles. El enlace biológico hipotético del gen DKFZP564O0283 al IBS a través de un efecto sobre la respuesta inmune, requiere una caracterización funcional adicional.

El gen se expresa principalmente en el colon y en la placenta, pero se ha encontrado también en muchos otros tejidos. El alineamiento de secuencia de aminoácido de los homólogos del ser humano, el ratón y la rata, demuestra una secuencia altamente conservada en la transmembrana y en las regiones intracelulares (51% de identidad de secuencia de AA) (Figura 5C).

Puesto que no se tiene conocimiento en la actualidad de ninguna información sobre el papel funcional de IBS1, la consecuencia del nivel de expresión incrementada en el colon de pacientes de IBS no está clara. Sin embargo, resulta sorprendente observar que dos conjuntos independientes de sondas de gen en la micro-matriz identificaron a este gen como el más significativo en dos análisis independientes (SAM y ANOVA mixto), y que solamente resulta posible una discriminación relativamente buena de IBS a partir uno sano en base a esos dos conjuntos de sondas (Figura 7, Figura 5B).

No está claro si los genes expresados diferencialmente son la causa, o por el contrario la consecuencia, de IBS. Puesto que el IBS es probablemente un desorden multifactorial, pueden estar involucrados muchos genes, cada uno de ellos con una contribución relativamente pequeña al fenotipo global. Nuestros resultados, que muestran principalmente cambios muy finos en la expresión de muchos genes de la mucosa colónica de pacientes de IBS, soportan este concepto. La expresión alterada de un gen específico fue, en algunos casos, observada en un solo subconjunto de pacientes de IBS; esto puede reflejar heterogeneidad de los mecanismos moleculares subyacentes con un fenotipo común. La mayor parte de los genes con cambios significativos de expresión están implicados en procesos celulares funcionales similares involucrados en la respuesta del anfitrión a antígeno intraluminal o a invasión bacteriana o a sus efectos pro-inflamatorios. Dado este grado de especificidad mecanicista en los genes identificados, se considera improbable que éstos representen falsas asociaciones positivas recogidas por azar usando las dos metodologías estadísticas aplicadas.

Potencial para Diagnóstico Molecular de IBS en base al perfil de expresión de gen de mucosa

Debido a su relevancia clínica, se evaluó a continuación el poder predictivo de una diagnosis molecular de IBS en base a perfiles de expresión sigmoidea de colon. Los 61 sujetos fueron por tanto divididos aleatoriamente en un conjunto de adiestramiento y uno de prueba. El conjunto de adiestramiento ($n = 45$) comprendía 17 sujetos sanos y 28 pacientes de IBS (16 de IBS-D, 12 de IBS-C); el conjunto de prueba ($n = 16$) comprendía los restantes 8 controles sanos y 8 pacientes de IBS (5 de IBS-D, 3 de IBS-C). A continuación, se aplicaron dos métodos de análisis de clasificación diferentes e independientes que han demostrado que se ejecutan bien sobre conjuntos de datos con muchas mediciones y relativamente pocas muestras, dado que son muy robustos frente a un sobreajuste. En primer lugar, usando Análisis de Predicción para micro-matrices (PAM) (Tibshirani et al., 2002) sobre el conjunto de validación, se obtuvo una signatura de 32 conjuntos de sonda de gen (Figura 8) con una tasa media de error de clasificación de validación cruzada del 22% (respectivamente, 13/17 y 22/28 se clasificaron correctamente respecto a sujetos sanos y de IBS). Usando esta signatura molecular sobre las muestras independientes en el conjunto de prueba, la PAM pronosticó correctamente el estado de enfermedad del 75% de los participantes, con una predicción igualmente precisa tanto para personas enfermas como sanas. El sobreajuste no pareció ser un problema puesto que las tasas de error de clasificación fueron similares para el conjunto de adiestramiento (22%) y para el conjunto de prueba (25%).

Con el fin de validar mejor la signatura molecular de 32 conjuntos de sonda de gen, se determinó la reproducibilidad. Así, la signatura molecular fue altamente reproducible entre muestras repetidas en el mismo paciente para muestras recogidas simultáneamente (concordancia $0,76 \pm 0,05$). Dentro de un paciente, la concordancia excedió significativamente la concordancia global entre participantes (concordancia $-0,02 \pm 0,02$; prueba de Mann-Whitney U

con varianzas desiguales; respectivamente, $W = 3938$, $p < 0,0001$ y $W = 7683$, $p < 0,0001$) (Figura 1B).

Finalmente, se intentó reducir aún más el número de sondas de la signatura molecular mediante la selección de sondas de gen que fueron identificadas de forma común mediante análisis de PAM y de SAM realizados sobre las muestras del conjunto de adiestramiento solamente. El conjunto resultante de 16 sondas, que representa 11 genes diferentes, fue usado después en un método de clasificación no supervisado, agrupamiento jerárquico, incluyendo el total de los 61 sujetos del estudio (es decir, ambos conjuntos de adiestramiento y de prueba). Este método de agrupamiento agrupa por una parte las sondas de gen con un perfil de expresión de gen similar entre el total de los diferentes sujetos, y por otra parte también agrupa las muestras colónicas con un perfil de expresión similar sobre el total de las 16 sondas de gen en una jerarquía agrupadora, usando enlace y correlación medidos como medición de similitud (Figura 9A). En el primer nivel de jerarquía de las sondas de gen (eje X), se hizo una distinción clara entre los conjuntos de sonda de gen que están sobre-regulados frente a los sub-regulados en pacientes de IBS frente a controles sanos. En el primer nivel de jerarquía de los sujetos (eje Y), se separó un subconjunto de pacientes de IBS de todos los demás sujetos, lo que parece estar fuertemente determinado por sus bajos niveles de expresión de F13A1, NCF4, M160, CSF1R, y/o FCGR2A. El segundo nivel de agrupamiento jerárquico separa además dos grupos, en gran medida correspondientes al grupo de pacientes de IBS y al de individuos sanos. Tal y como podía esperarse en relación con las muestras del conjunto de adiestramiento que se usaron para seleccionar los conjuntos de sonda para la clasificación, se observó una buena separación (respectivamente 14/17 y 25/28 clasificados correctamente para los sujetos sanos y los pacientes de IBS). Sobre todo, para los sujetos del conjunto de prueba, 11 de los 16 fueron clasificados correctamente (69%), lo que está en línea con los resultados del análisis PAM descrito con anterioridad. El valor predictivo positivo (es decir, la probabilidad de que personas con signatura molecular sean de hecho pacientes de IBS: 6/8) fue del 75%, mientras que el valor predictivo negativo (es decir, la probabilidad de que personas que carecen de la signatura molecular no sean pacientes de IBS: 5/8) fue del 63%. Los estudios futuros permitirán determinar de manera más precisa el valor predictivo, la sensibilidad y la especificidad, aunque siempre esté claro que estas signaturas moleculares en el colon mucosal tienen el poder de identificar a la mayoría de los pacientes de IBS. Este hallazgo demuestra la posibilidad de definir subgrupos específicos de pacientes de IBS en base a una signatura molecular común, y con ello allana el camino hacia una medicina más personalizada. La evaluación de signaturas moleculares en biopsias de colon proporciona una nueva herramienta complementaria para ayudar a un médico a decidir sobre el diagnóstico de IBS, y sobre la estrategia terapéutica más beneficiosa para un paciente individual. Debe considerarse una influencia potencial del género o del tratamiento con medicamento sobre los resultados. Una representación gráfica de la distribución de género y de tratamiento con medicamento sobre el conjunto total, ha sido incluida en la Figura 9B, sugiriendo que cualquier efecto potencial sobre el análisis de clasificación por parte de estos cofundadores potenciales habría sido solamente marginal. Esto fue confirmado mediante un análisis adicional ANOVA mixto usando el conjunto de genes de signatura. Se encontró que:

- a. la medicación no afectó al nivel de expresión de estos genes (todos $q > 0,7$ para probar el efecto de la medicación)
- b. no existió ninguna interacción entre la medicación y la enfermedad que indique que la expresión de gen no estuvo influenciada por la medicación dependiendo del estado de enfermedad, es decir sanos frente a IBS todos $q > 0,1$ para probar interacción entre medicación y estado de salud)
- c. el género no afectó al nivel de expresión de estos genes de signatura (todos $q > 0,9$ para probar el efecto de la medicación) o a la diferencia entre sanos y pacientes de IBS (todos $q > 0,9$ para probar la interacción entre el género y el estado de enfermedad).

Datos confirmatorios respecto a cambios en la expresión de gen hallados mediante análisis de micro-matriz por reacción de cadena de polimerasa cuantitativa de transcripción reversa (RTQ-PCR), de tecnología independiente

12 genes que fueron identificados mediante análisis de datos de micro-matriz, fueron seleccionados a efectos de análisis confirmatorio mediante ensayos bajo demanda (Applied Biosystems) de expresión de gen TaqMan fluorogénicos validados. La normalización de los resultados del ensayo TaqMan se hizo en relación con el gen de control SART1, puesto que se encontró que este gen era el más rápido en ser estable y también está moderadamente expresado en muestras de colon (Camilleri M et al., Gastroenterología 2007). Sobre todo, los datos muestran una concordancia sustancial entre pacientes de IBS y sujetos sanos (Figura 10). Con la excepción del gen FCR2A, 11 de los 12 genes analizados mostraron la misma tendencia a la expresión sobre- o sub-regulada en IBS en comparación con sujetos sanos. Se confirmaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre sujetos con IBS y sanos en 6 de los 12 genes, y éstos representaban los genes con valores de cambio un mayor número de veces. Este nivel de significación no se consiguió para genes con una diferencia de veces de cambio más sutil. Esto puede ser explicado, en parte, por el hecho de que el método TaqMan solamente normaliza los datos de expresión de gen frente a un único gen de referencia (SART1 en nuestro ensayo), mientras que el método de micro-matriz permite una normalización del nivel de expresión de cada gen individual frente a otros genes de la micro-matriz. Esto significa que incluso variaciones de expresión de gen relativamente pequeñas del gen SART1 introducirán ruido (y variación) en el nivel de expresión normalizado del los genes de interés usando la tecnología de RTQ-PCR. De ese modo, aunque la tecnología TaqMan tiene algunas ventajas con relación a la sensibilidad en comparación con las micro-matrices (es decir, se pueden analizar genes con baja expresión usando RTQ-PCR donde la tecnología de micro-

matriz puede fallar), está claro que las variaciones intra-grupo relativamente más grandes se encuentran con frecuencia para ensayos TaqMan en comparación con los análisis de micro-matriz.

En resumen, los datos generados mediante ensayos TaqMan confirman en gran medida los datos de micro-matriz con relación al número de veces de cambio de los niveles de los genes individuales.

- 5 Como conclusión, se encuentran varios genes expresados diferencialmente en la mucosa colónica de pacientes de IBS. Muchos de estos genes están dirigidos hacia un cambio de los mecanismos de defensa del anfitrión. Las proteínas involucradas en los mecanismos de defensa del anfitrión o aquellas codificadas por los genes diferencialmente expresados, pueden representar objetivos potenciales para el desarrollo de nuevos medicamentos para IBS. El gen más significativo con una expresión elevada en pacientes de IBS codifica una proteína de
- 10 membrana pobremente caracterizada (DKFZP564O0823) de función poco clara, para el que se propone el nombre de IBS. Las firmas moleculares de expresión de gen en el colon, en base a un conjunto limitado de genes, puede ser predictiva de estado de enfermedad de IBS. Estos perfiles de expresión de gen son estables durante varios meses, sugiriendo que las firmas moleculares tienen potencial para mejorar el diagnóstico de IBS y monitorizar efectividad terapéutica. Como mínimo, estas diferencias biológicas en pacientes con IBS sugieren que
- 15 existen diferencias objetivas en el colon y que la enfermedad no representa exclusivamente un desorden de percepción del sistema nervioso central.

LISTADO DE SECUENCIA

- <110> Janssen Pharmaceutica NV Mayo Clinic Rochester
- <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA TRATAR Y DIAGNOSTICAR SÍNDROME DE INTESTINO
- 20 IRRITABLE
- <130>
- <160> 16
- <170> Patente en versión 3.1
- <210>
- 25 <211> 456
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> ID Sonda Affymetrix No.: 206011_at
- 30 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1) ... (456)
- <223> n representa cualquier nucleótido
- <400> 1
- aatgctctaaaatccaacactgtgtgagcgccacatgatattcaaaggaaatgtttattga
- aacatttc aaattanaggtttttggattagggatgctaaaccagtaagtatacagctgaatt
- ccaatatacaaaaatatctgaaatttgaaatacttctggttagcatgcattttggaataagggga
- taatcaagccatatacagaaaatactgaagtaatgcctttcttctggtcagtgagagcacg
- ttgctcttctcccaaagtttttcatttagacccttttgagattcatctgatattggcctag
- aagtggccgtaagactacaaaccctcacttttggtatgttctctccttcacctcagcagggt
- atatttaaacatagcatgtggtctttccttttaaaattgtgtatgttccattggtgtgata
- actttataaacttgcatgtcttt
- 35
- <210> 2
- <211> 311
- <212> ADN
- 40 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> ID de Sonda Affymetrix No. 211367_s_at

<400> 2

gagctgaggttgacatcacaggcatgacaatgctgctacaaaatctggggtacagcgtagat
gtgaaaaaaaaatctcactgcttcggacatgactacagagctggaggcatttgacacccgccc
agagcacaagacctctgacagcacgttcctgggtgttcatgtctcatgggtattcggaaggca
tttggtggaagaaacactctgagcaagtcccagatataactacaactcaatgcaatctttaac
atgttgaataccaagaactgccaagtttgaaggacaaaccgaaggtgatcatcatccaggc
c

5 <210> 3
<211> 548
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> ID de Sonda Affymetrix No. 211366_x_at

<400> 3

gcacaagacctctgacagcacgttcctgggtgttcatgtctcatgggtattcggaaggcattt
gtggaagaaacactctgagcaagtcccagatataactacaactcaatgcaatctttaacatg
ttgaataccaagaactgccaagtttgaaggacaaaccgaaggtgatcatcatccaggcctg
ccgtgggtgacagccctgggtgtggtgtggtttaaagattcagtaggagtttctggaaacctat
ctttaccaactacagaagagtttgaggatgatgctattaagaaagcccacatagagaaggat
tttatcgctttctgctcttccacaccagataatgtttcttgagacatcccacaatgggctc
tgttttttattggaagactcattgaacatatgcaagaatatgcctgttcctgtgatgtggagg
aaattttccgcaaggttcgattttcatttgagcagccagatggtagagcgcagatgcccacc
actgaaagagtgactttgacaagatgtttctacctcttcccaggacattaaa

15 <210> 4
<211> 387
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> ID de Sonda Affymetrix No. 209970_x_at

<400> 4

cgaaggatgatcatcatccaggcctgccgtgggtgacagccctgggtgtgggtgtgggtttaaagat
tcagtaggaggtttctggaaacctatctttaccaactacagaagagtttgaggatgatgctat
taagaaagcccacatagagaaggattttatcgctttctgctcttccacaccagataatgttt
cttgagacatcccacaatgggctctgtttttattggaagactcattgaacatatgcaagaa
tatgcctgttcctgtgatgtggaggaaatccccgcaagggtcgattttcatttgagcagcc
agatggtagagcgcagatgccaccactgaaagagtgactttgacaagatgtttctacctct
tcccaggacattaaa

5 <210> 5
<211> 210
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ID de Sonda Affymetric No. 211368_s_at

<400> 5

10

aatgtttcttgagacatcccacaatgggctctgtttttattggaagactcattgaacatat
gcaagaatatgcctgttcctgtgatgtggaggaaatccccgcaagggtcgattttcatttg
agcagccagatggtagagcgcagatgccaccactgaaagagtgactttgacaagatgtttc
tacctcttcccaggacattaaaat

15 >210> 6
<211> 206
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ID de Sonda Affymetrix No. 1552703_s_at

<400> 6

ttccatgggtgaagggtacaataaatggcttactggatgaattattacagacaaggggtgctga
accaggaagagatggagaaagtaaaacgtgaaaatgctacagttatggataagacccgagct
ttgattgactccgttattccgaaaggggcacaggcatgccaaatttgcatcacatacatttg
tgaagaagacagttacctgg

20

25 <210> 7
<211> 55
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ID de Sonda Affymetrix No. 1552701_a_at

<400> 7
Aggtccgatacctggaaattagcttagtacacaagactcccaattactatttct

30 <210> 8
<211> 295

ES 2 400 676 T3

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ID de Sonda Affymetrix No. 201762_s_at

5 <400> 8

caacacctgatccccaagattgaagatggaaatgattttggggtagcaatccaggagaaggt
gctggagaggggtgaatgccgtcaagaccaaagtggagctttccagacaaccatttccaagt
acttctcagaacgtggggatgctgtggccaaggcctccaaggagactcatgtaatggattac
cgggccttgggtgcatgagcgagatgaggcagcctatggggagctcagggccatggtgctgga
cctgagggccttctatgctgagctttatcatatcatcagcagcaacc

10 <210> 9
<211> 454
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ID de Sonda Affymetric No. 203305_at

15 <400> 9

gtccttcacatcaccattttgagacctcagcttggcactcaggtgctgaagggtaatatgga
ctcagccttgcaaatagccagtgctagtctgaccaaccacagaggatgctgacatcattt
gtattatgttccaaggctactacagagaaggctgcctgctatgtatttgcaaggctgattta
tggtcagaattttccctctgatatgtctagggtgtgatttaggtcagtagactgtgattctta
gcaaaaaatgaacagtgataagtatactgggggcaaaatcagaatggaatgctctggtctat
ataaccacatttctgagcctttgagactgttctgagccttcagcactaacctatgaggggtg
agctgggtcccctctatatatacatcatacttaactttactaagtaatctcacagcatttgcc
aagtctcccaatatccaatt

20 <210> 10
<211> 497
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ID de Sonda Affymetrix No. 205147_x_at

25 <400> 10

agcagaggctctatTTgacttCactggaaacagcaaactggagctgaatttcaaagctggag
atgtgatcttCctcctcagtcggatcaacaaagactggctggagggcactgtccggggagcc
acgggcatcttCctcctcctccttcgtgaagatcctcaaagacttccctgaggaggacgaccc
caccaactggctgCGTTgctactactacgaagacacccatcagcaccatcaaggacatcgCGG
tggaggaagatctcagcagcactcccctattgaaagacctgctggagctcacaaggcgggag
ttccagagagaggacatagctctgaattaccgggacgctgagggggatctggttcggtgct
gtcggatgaggacgtagCGctcatggtgCGgcaggctcgtggcctcccctcccagaagCGcc
tcttcccctggaagctgcacatcacgcagaaggacaactacagggtctacaacacgatGCCA
t

<210> 13

<211> 440

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ID de Sonda Affymetrix No. 223655_at

<400> 11

tctatgggactgtcacGCCaaaccctggggacagagtgactgtggacacaaggaagatgctg
gcgtgagggtgctctggacagtcgctgaaatcactgaatgcctcctcaggtcgtttagcactt
atTTtatccagtatcttTgggctccttctcccggttctgtttattctatttctcacgtgggtg
ccgagttcagaaacaaaaacatctgcccctcagagtttcaaccagaaggaggggttctctcg
aggagaatttattccatgagatggagacctgcctcaagagagaggacccacatgggacaaga
acctcagatgaccccccaaccatggttgtgaagatgctagcgacacatcgctgttgggagt
tcttctgcctctgaagccacaaaatgactttagacttccagggtcaccagatcaacctct
aaatat

10

<210> 12

<211> 482

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ID de Sonda Affymetrix No. 203104_at

<400> 12

20

tgttggcctcgtgtttgctatgccaaactagtagaaccttctttcctaatacccttatcttca
tggaaatggactgactttatgcctatgaagtccccaggagctacactgatactgagaaaacc
aggctctttggggctagacagactggcagagagttagatctccctctctgagaggagcagca
gatgctcacagaccacactcagctcaggccccttgagcaggatggctcctctaagaatctc
acaggacctcttagtctctgccctatacgccgccttactccacagcctcaccctcccacc
cccatactggtagtctgtaatgagccaagtggcagctaaaagttgggggtgttctgccag
tcccgctattctgggctagaaggcaggggaccttggcattggctggccacaccaagcaggaa
gcacaaactcccccaagctgactcatcctaactaacagtcacgccgtg

<210> 13
<211> 515
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ID de Sonda Affymetrix No. 203561_at
<400> 13

10

tgctgggatgaccagcatcagccccaatgtccagcctctttaacatcttctttcctatgccc
tctctgtggatccctactgctggtttctgccttctccatgctgagaacaaaatcacctattc
actgcttatgcagtcggaagctccagaagaacaaagagcccaattaccagaaccacattaag
tctccattgttttgccttgggatttgagaagagaattagagaggtgaggatctggtatttcc
tggaactaaattccccttggggaagacgaagggatgctgcagttccaaaagagaaggactctt
ccagagtcattctacctgagtcccaaagctccctgtcctgaaagccacagacaatatgggtccc
aatgactgactgcaccttctgtgcctcagccgttcttgacatcaagaatcttctgttccac
atccacacagccaataacaattagtcacaaaccactgttattaacagatgttagcaacatgaaaga
cgctatgttacaggttaca

<210> 14
<211> 477
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ID de Sonda Affymetrix No. 205968_at
<400> 14

20

25

attgtggtgagcgatcctgactccacagatgcttcaagcattgaagacaatgaggacatttg
taacaccacctccttggagaattgcacagcaaatgagcgggggtgtttgtgcctgtttctc
ttatcctttcccaacattaggttaacacagctttataaacctcagtgggttcgttaaaatca
tttaattctcaggggtgtacctttccagccatagttggacattcattgctgaattctgaaatg
atagaattgtctttatcttctgtgaggtcaattaaatgccttggtctgaaatttatttt
ttacaagagagagttgtgatatagtttggaatataagataaatggtattgggtgggtttgt
ggctacagcttatgcatcattctgtgtttgtcatttactcacattgagctaactttaatta
ctgacaagtagaatcaaagggtgcagctgactgagacgacatgc

<210> 15
<211> 512
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<112> ID de Sonda Affymetrix No. 204687_at

<400> 15

aatctctatttatctggttggttctgacaggatgctgcctgcttggtctacaagctggaaa
gcagcttcttagctgcctaattaatgaaagatgaaaataggaagtgcctggagggggccag
caggtcacggggcagaatctctcaggttgctgtgggatctcagtgtgcccctacctgttctc
ccctccaggccacctgtctctgttaaaggatgtctgctctgttcaaaaggcagctgggatccc
agcccacaagtgatcagcagagttgcatttcaaagaaaaaggctatgagatgagctgagtt
atagagagaaagggagagggcatgtacgggtgtgggaagtggaaggaagctggcgggggaga
aggaggctaacctgcactgagtacttcattaggacaagtgagaatcagctattgataatggc
cagagatatccacagcttgaggagcccagagaccgtttgctttataccacacagcaactg
gtccactgctttactg

10

<210> 16
<211> 228
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ID de Sonda Affymetrix No. 229369_at

<220>
<221> misc_feature
20 <222> (1) ... (228)
<223> n representa cualquier nucleótido

<400> 16

ggggtggcgcaaggaggaggaaagggcttgagttaaaagcgggtgcctgcaaccctcaaac
tccgacatcattcagtgtgttaggggcaggaggtgtgttcagccgtggaatttgctgggtg
gcagcagtgtaacctgtgtatttgagggtacaggcaancggtacaggggtggagtggctggtc
cacaagctgtggcaggggaagctgtttgcaggactgccctgcc

REIVINDICACIONES

1.- Un método *in vitro* para detectar y/o monitorizar Síndrome de Intestino Irritable (IBS) en un sujeto, comprendiendo dicho método:

- 5 (a) determinar, en una muestra biológica de dicho sujeto, el nivel de transcripción de gen de al menos el grupo consistente en:
 - Síndrome de Intestino Irritable 1 (IBS1) representado por SEQ ID NO. 15,
 - Seudo-ICE inhibidor negativo dominante de caspasa 1 (COP1),
 - Subunidad 2 activadora de proteasoma (PA28 beta) (PSME2),
 - 10 - Factor XIII de coagulación, polipéptido A1 (F13A1),
 - Factor 4 citosólico de neutrófilo, 40 kDa (NCF4),
 - Receptor de factor-1 de estimulación de colonia (CSFR1),
 - Proteína de tipo 1 rica en cisteína receptora limpiadora (M160),
 - Canal con puerta de tensión de potasio, rectificador retardado, subfamilia S, miembro 3 (KCNS3)
 - 15 - V-set y dominio de inmunoglobulina que contiene, 2 (VSIG2).
 - Fragmento FC de IgG, Ila de baja afinidad, receptor (FCGR2A), y
 - Caspasa 1, peptidasa de cisteína relacionada con apoptosis (CASP1),
- (b) comparar el nivel de transcripción de gen con el nivel de transcripción de gen de una muestra de control normal, y
- 20 (c) determinar la presencia de IBS y/o su estado en base al resultado de la etapa (b).

2.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además determinar el nivel de transcripción de gen de:

- MUC 20 (Mucina 20)
- butirofilina tipo 8 (BTNL8),
- 25 - V-set y dominio de inmunoglobulina que contiene, 4 (VSIG4),
- lisozima (LYZ)
- activador de homólogo 2 de ATPasa de proteína de choque térmico de 90 kDa (AHSA2),
- mini-cromosoma deficiente de mantenimiento 5 (MCM5)
- C6orf11,
- 30 - 4-dominios que abarcan la membrana, subfamilia A, miembro 4 (MS4A4A),
- Factor de crecimiento 1 de tipo insulina (IGF1),
- Helicasa, específica de linfocitos (HELLS),
- Antígeno CD74,
- Supresor 2 de tipo HRAS (HRASLS2), y
- 35 - UDP-glucuronosil transferasa 2B15 (UGT2B15).

3.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el nivel de transcripción de gen se determina usando una matriz de sondas seleccionadas a partir de las sondas relacionadas en la Tabla 1 o la Tabla 2.

4.- Kit de diagnóstico que consiste en:

- un conjunto de sondas que específicamente se enlazan a mRNA o a las moléculas de ácido nucleico

derivadas del mismo de IBS1 representado por SEQ ID NO. 15, COP1, PSME2, NCF4, CSFR1, M160, KCNS3, VSIG2, FCGR2A y CASP1.

5.- Uso de un conjunto de sondas que se enlazan específicamente a mRNA o a las moléculas de ácido nucleico derivadas del mismo de los IBS-MSGs que comprenden IBS1 representado por SEQ ID NO. 15, COP1, PSME2, F13A1, NCF4, CSFR1, M160, KCNS3, VSIG2, FCGR2A y CASP1, para la detección de IBS.

6.- El uso del conjunto de sondas de la reivindicación 5 en un método según la reivindicación 1.

10

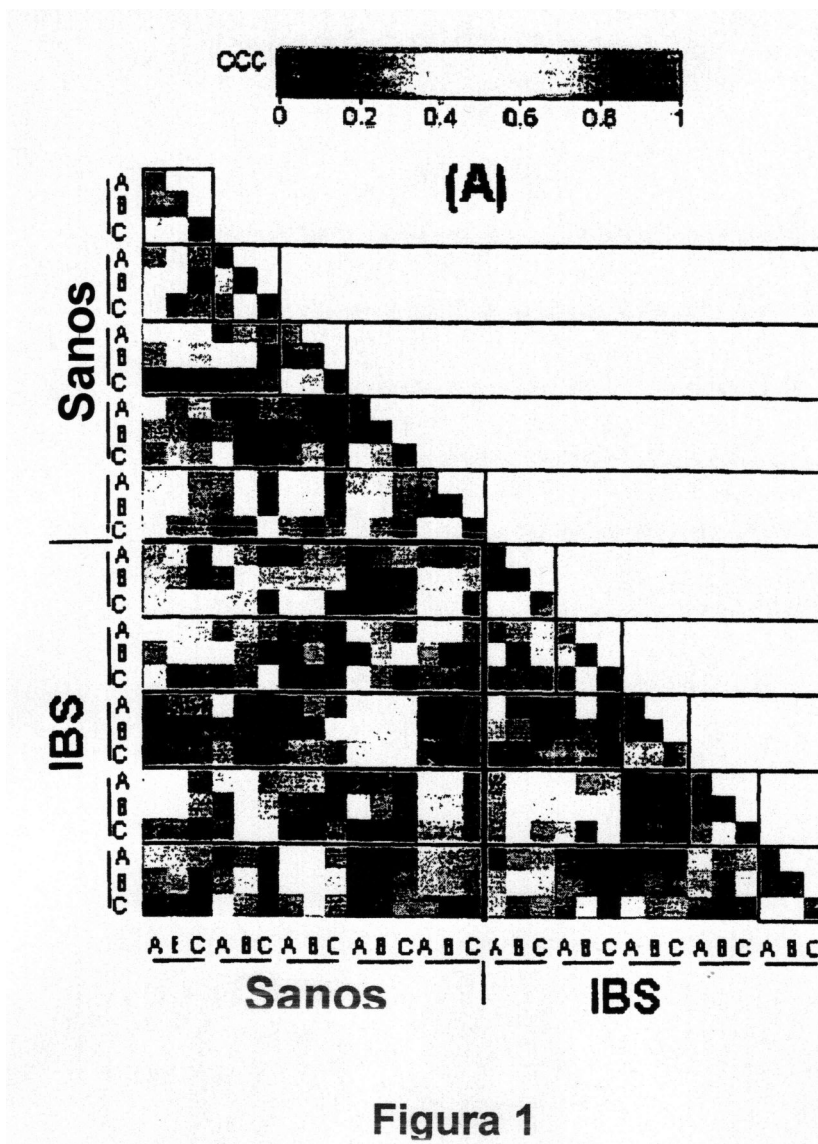
15

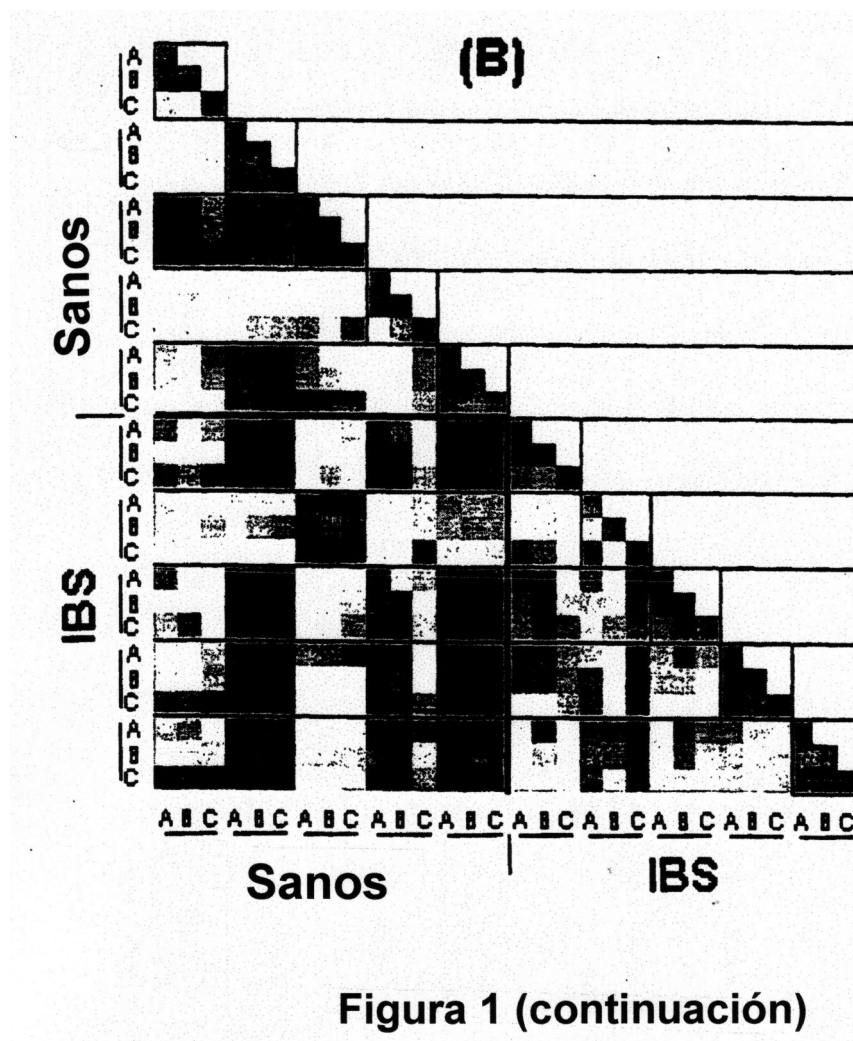
20

25

30

35





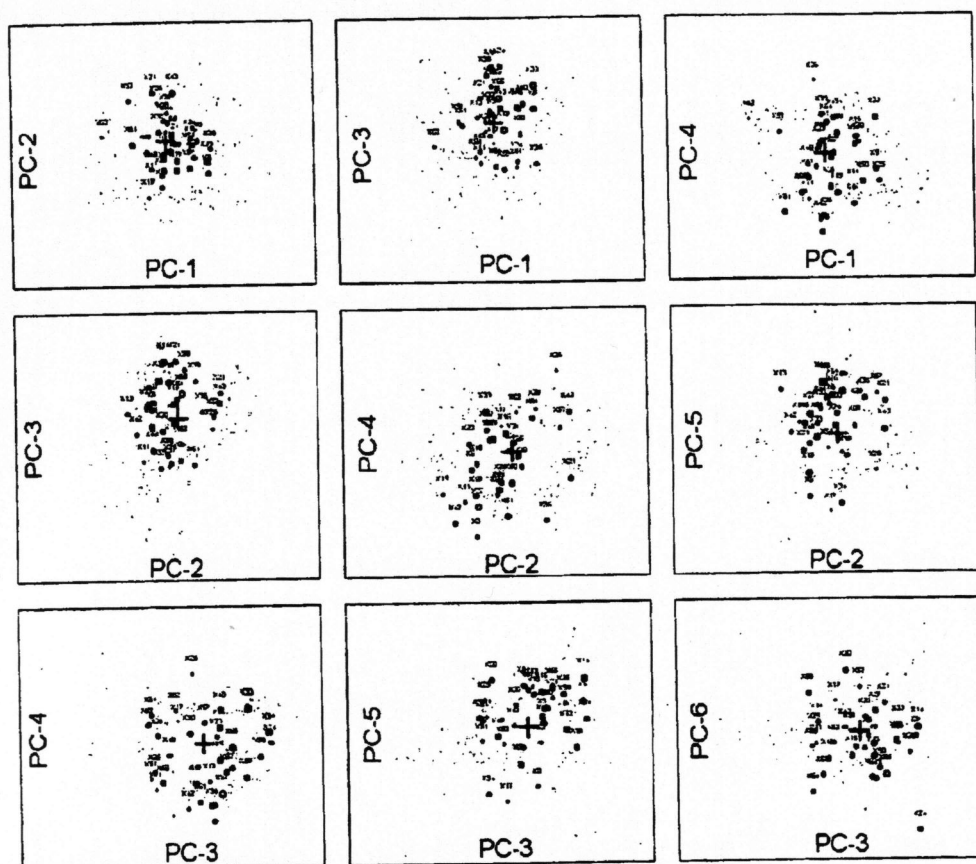


Figura 2

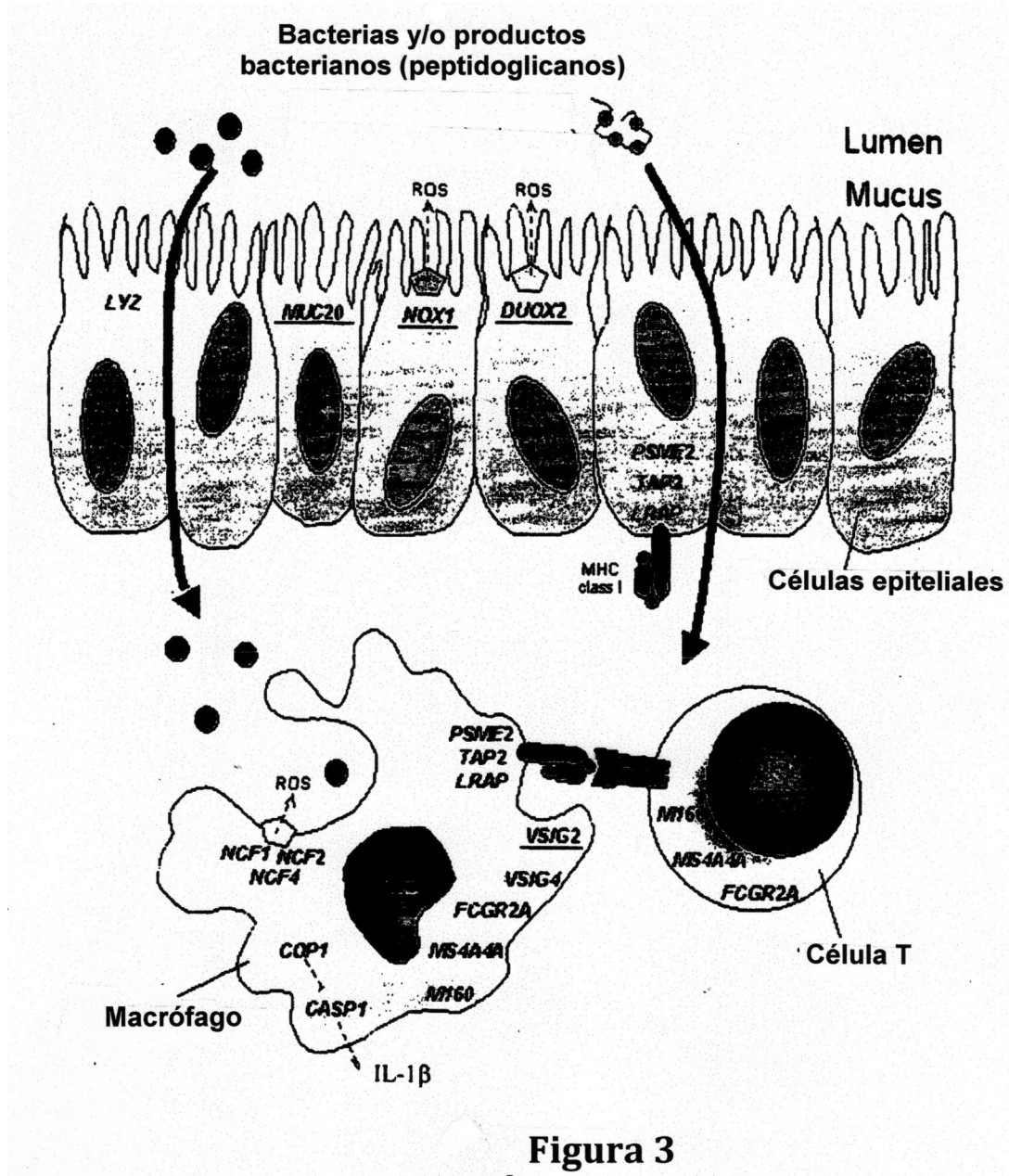


Figura 3

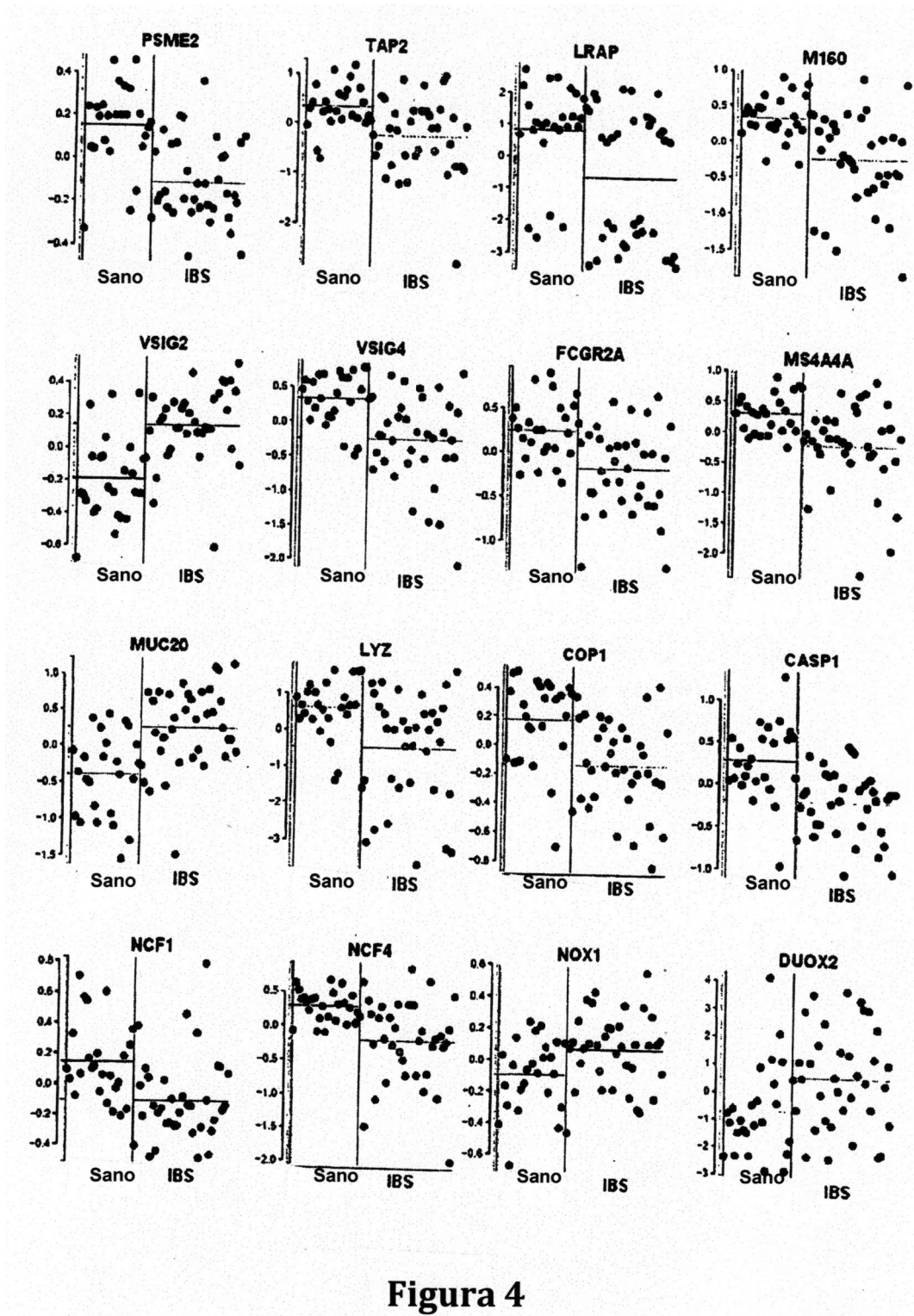
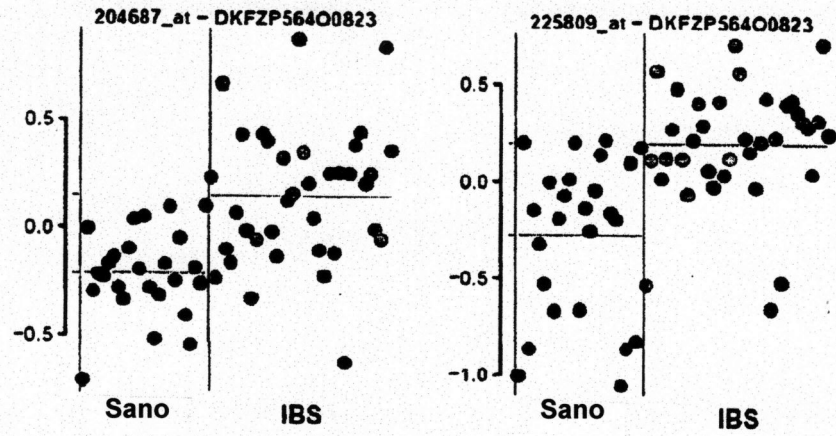


Figura 4

(A)



(B)

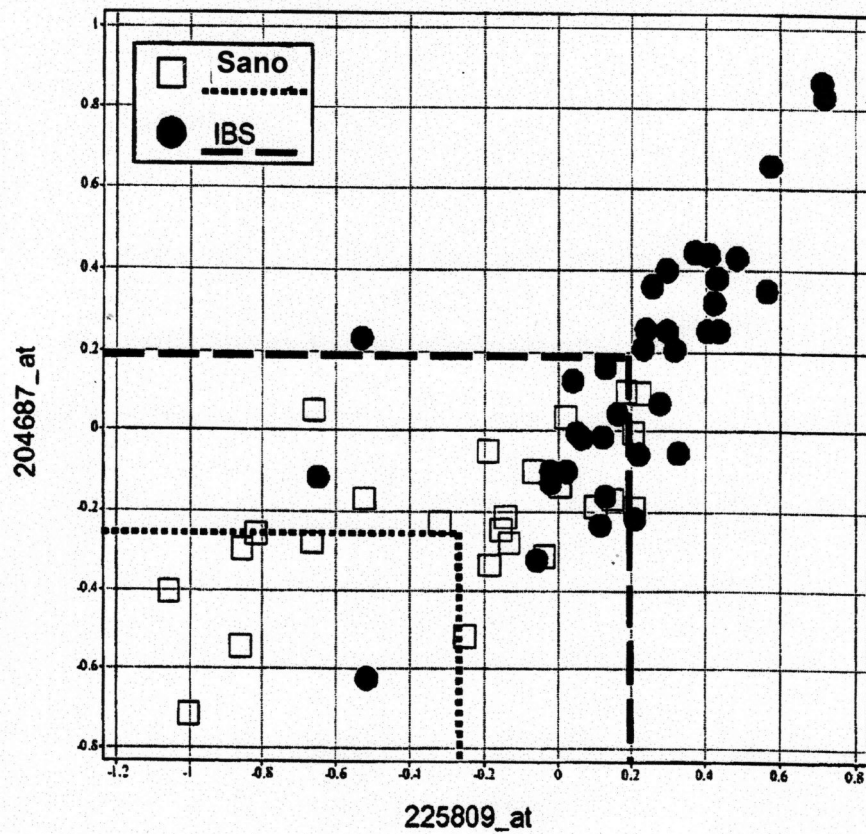


Figura 5

(C)

Hs_NP_056208 : MVYKTLFALCILTAGWRVQSLPTSAPLSVSLPENIVPPTTIWTSSPNTD : 50
Mm_NP_663537 : MVCKVLLIALCIFTAGLRVQSP-TVPLPVSLMTKSSAPVATWTTTSAPHTA : 49
Rn_NP_775137 : MVCKALITLCIFAAAGLMVQSSPTPTLLPVSLTTKSTAPMATWTTSAQHTA : 50

[Sequence alignment bar]

Hs_NP_056208 : ADTASPSNGTHNNSVLPVTASAPTSLLPKNISIESREEEITSPGSNWEGT : 100
Mm_NP_663537 : RETTPVASATHNASVLRRTAASLTSQLPT---D-HREEAVTSPPLKRDVN : 95
Rn_NP_775137 : METTPVASATHNASVLRRTAASLTSQLPTH---REEAVTSPPLKREVN : 96

[Sequence alignment bar]

Hs_NP_056208 : NTDPSPSGFSSTSGGVHLITLLEHSSCTPEAGVAATLSQSAAEPPTLIS : 150
Mm_NP_663537 : STDSSPAGFPSTSSDGHLPATPEEHSLSGSPATVPATGSQS----PMLLS : 141
Rn_NP_775137 : STDSSPTGFSNSSGIHLAPTPPEHSLGSPETSVPATGSQS----PTLLF : 142

[Sequence alignment bar]

Hs_NP_056208 : POMPASSPSSLSTSTPEPVFSASVTTNHSSVTSTOPTGAPTAPESPTEES : 200
Mm_NP_663537 : SQAPTSATTSFATSLSESLSASVTSSHNSTVANIQTAPMAPASPTEEH : 191
Rn_NP_775137 : SQGPTSASTSPATSESEPLSASVTSNHSSVTNNIOPTGAPMAPASPTEEH : 192

[Sequence alignment bar]

Hs_NP_056208 : SSDHTPTSHATAEPVPEKTPPTVSGKVMCELDIMETTTFPRVIMQEV : 250
Mm_NP_663537 : SSSHTPTSHVTAEPVPKEKSPQDTEPGKVICES-----ETTPFLIMQEV : 236
Rn_NP_775137 : SSSHTPTSHMT-EPVPKEKSPQDTEPGKVICES-----ETTPFLIMQEV : 236

[Sequence alignment bar]

Hs_NP_056208 : EHALSSGSIAAITVTVIAVVLVFGVAAYLKIRHSSYGRLLDDHDYG--S : 298
Mm_NP_663537 : EHALSSGSIAAITVTVIAVVLVFGGAAYLKIRHSSYGRLLDDHDYG--S : 284
Rn_NP_775137 : EHALSSGSIAAITVTVIAVVLVFGAAAYLKIRHSSYGRLLDDHDYGS : 286

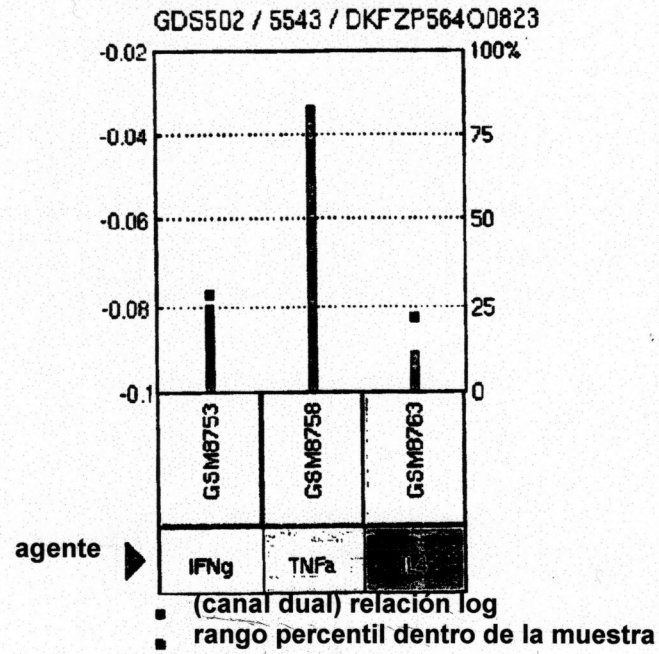
[Sequence alignment bar] Cytoplasmic region

Hs_NP_056208 : WGNYNPLYDDS : 310
Mm_NP_663537 : WGNYNPLYDDS : 296
Rn_NP_775137 : WGNYNPLYDDS : 298

[Sequence alignment bar]

Figura 5 (continuación)

(A)



(B)

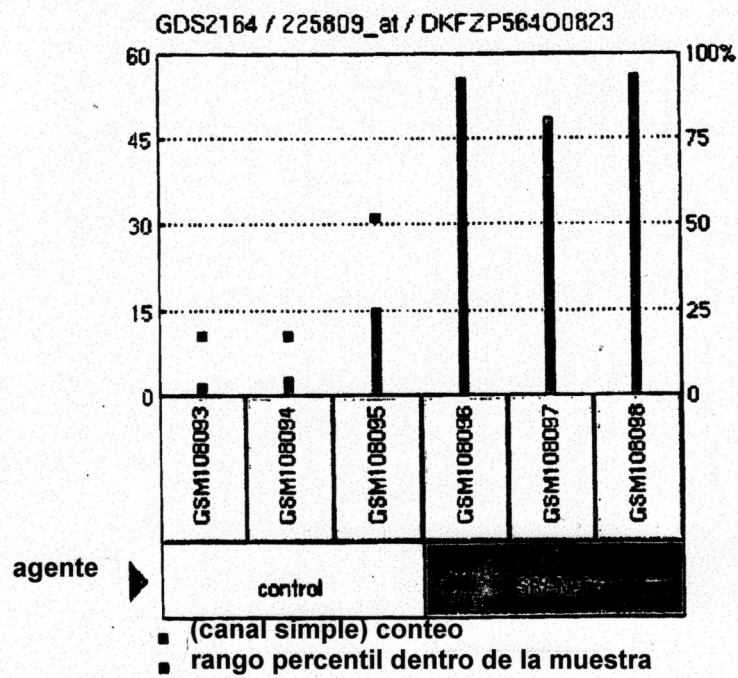


Figura 6

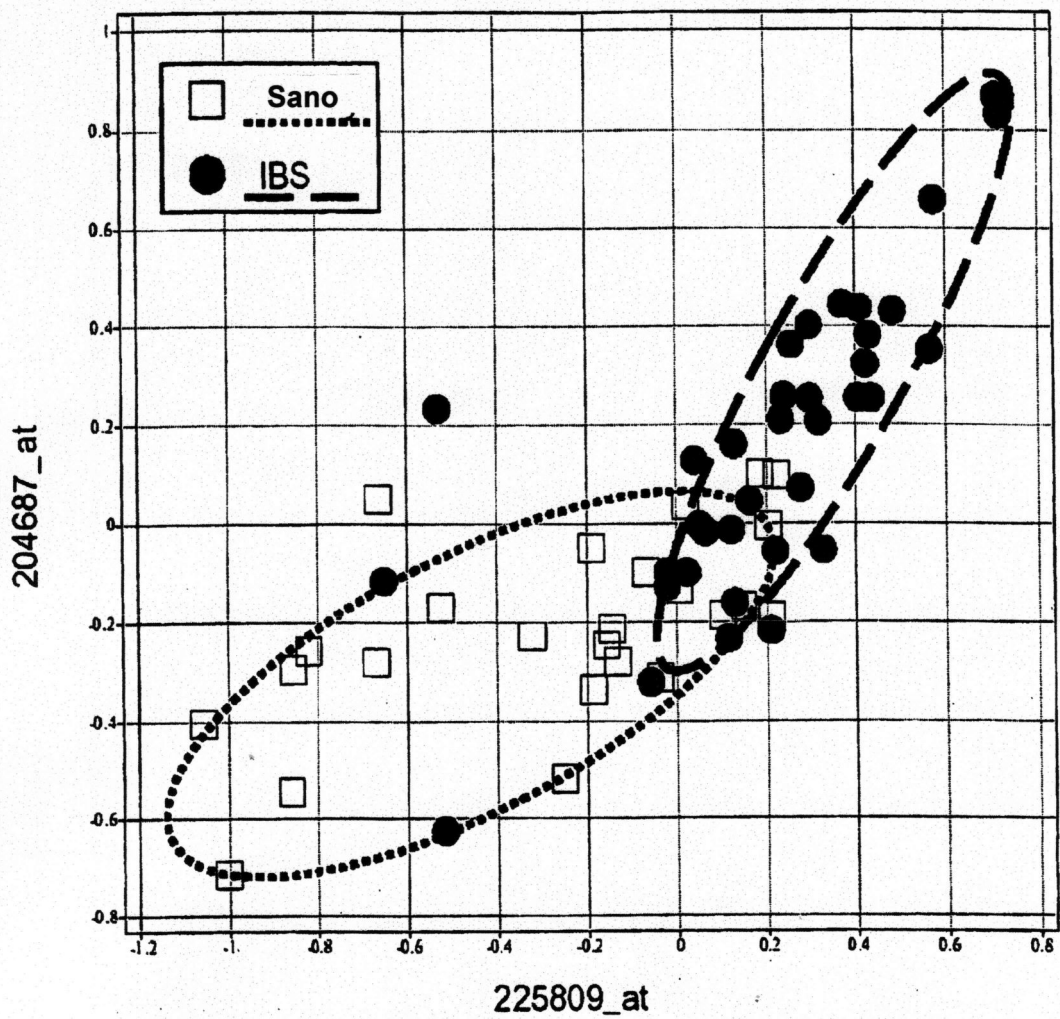


Figura 7

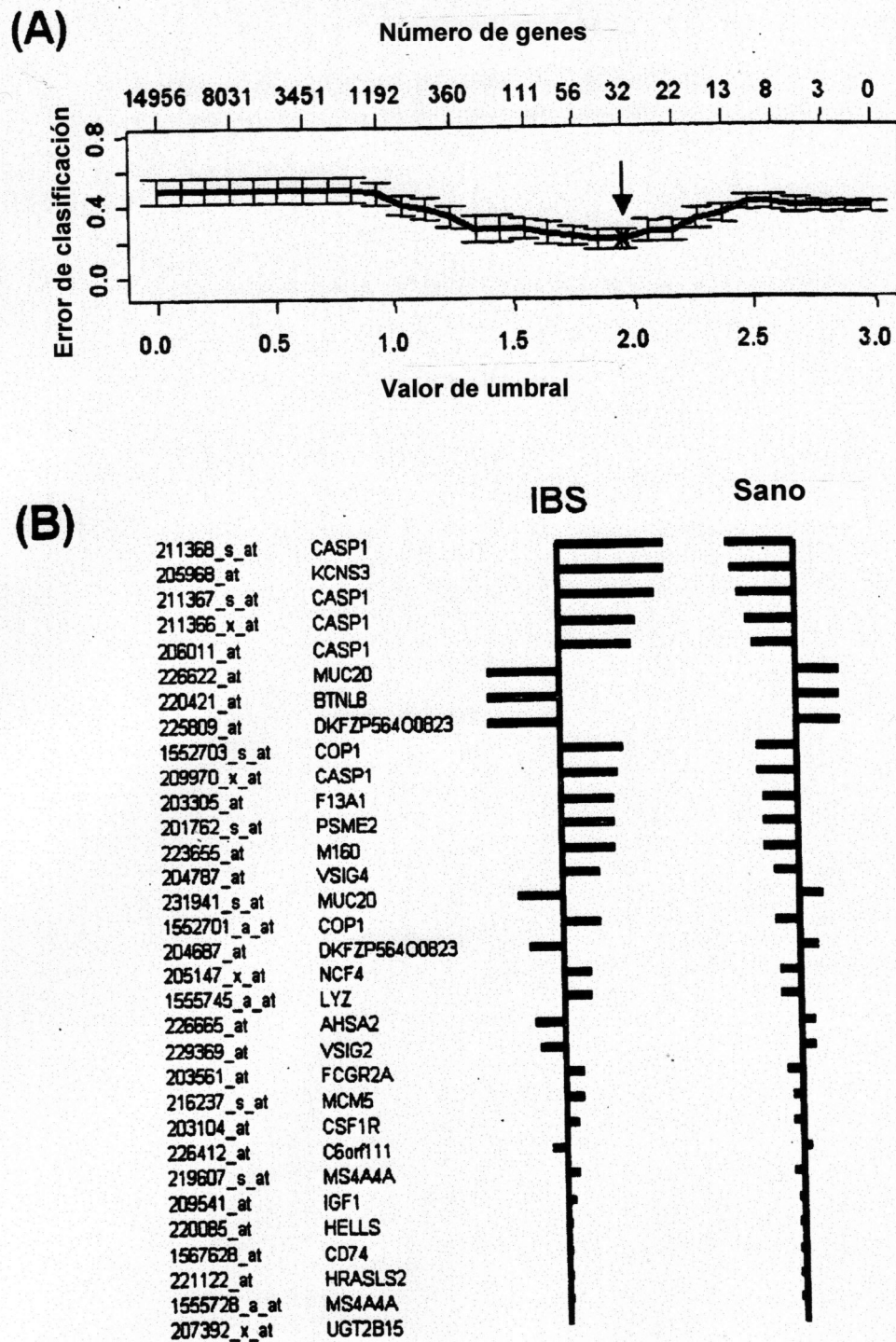
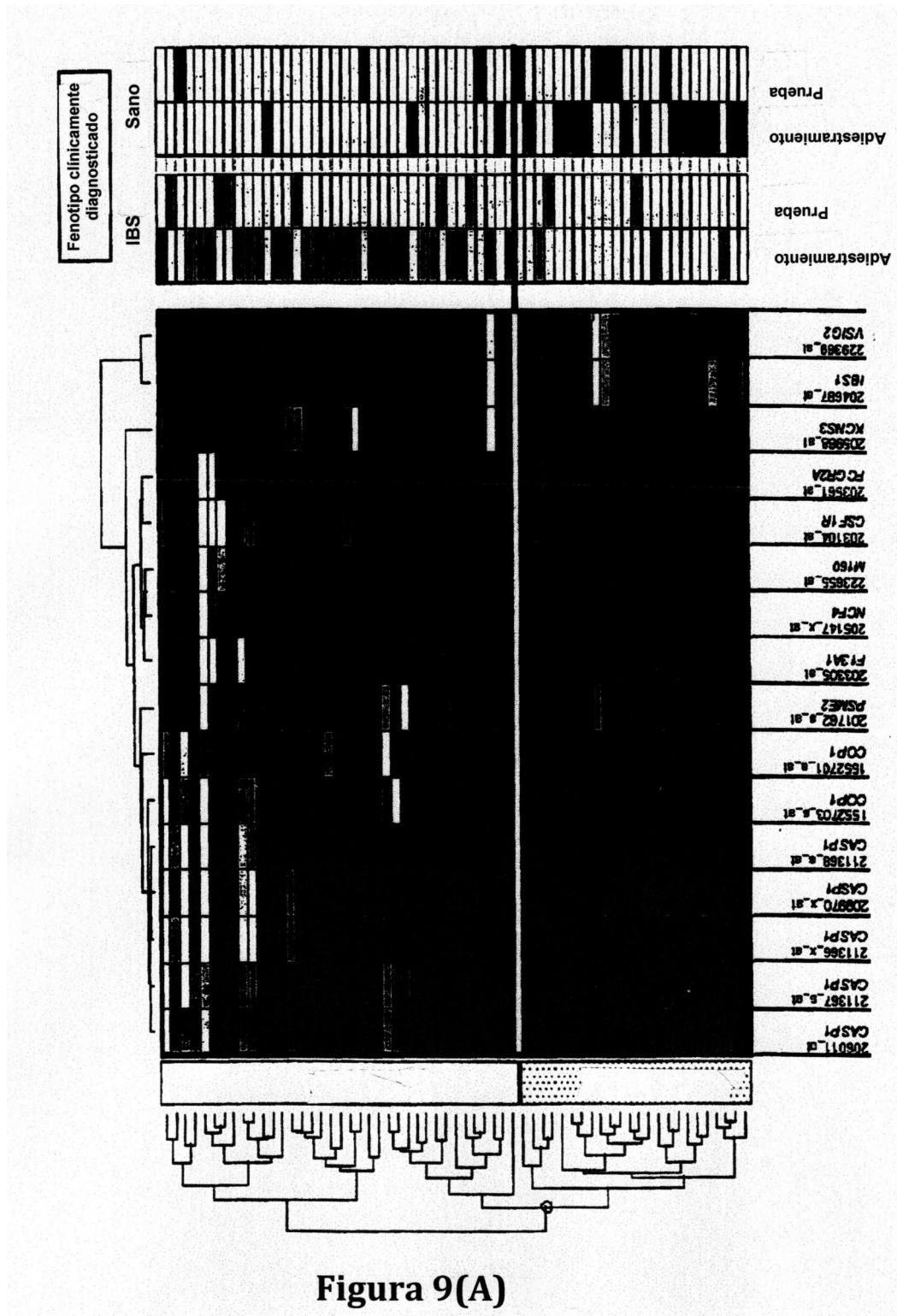


Figura 8



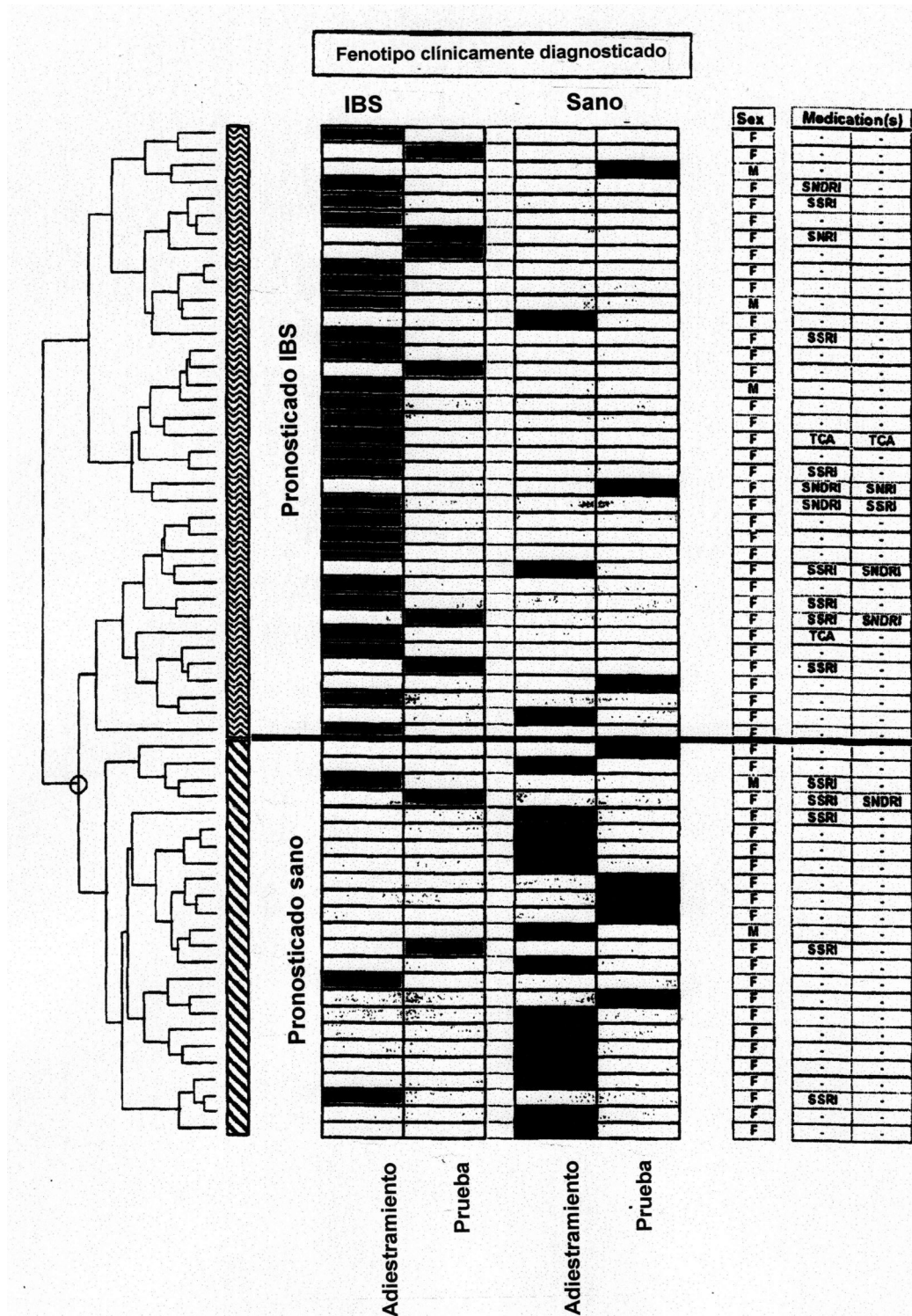


Figura 9(B)

