

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 895 880**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/68
(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2016 PCT/EP2016/073880**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **13.04.2017 WO17060353**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2016 E 16787748 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.08.2021 EP 3359967**

(54) Título: **Métodos para tratar enfermedades inflamatorias y otras enfermedades, y uso de biomarcadores como predictores de sensibilidad clínica al tratamiento con apremilast**

(30) Prioridad:

06.10.2015 US 201562237910 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.02.2022

(73) Titular/es:

**AMGEN (EUROPE) GMBH (100.0%)
Floor 6-8, Suurstoffi 22
6343 Risch-Rotkreuz, CH**

(72) Inventor/es:

**SCHAFER, PETER H. y
TROTTER, MATTHEW WILLIAM BURNELL**

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 895 880 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

Métodos para tratar enfermedades inflamatorias y otras enfermedades, y uso de biomarcadores como predictores de sensibilidad clínica al tratamiento con apremilast

- 5 **1. ANTECEDENTES**
- 10 Las enfermedades inflamatorias, tales como artritis o afecciones artríticas relacionadas (por ejemplo, espondilitis anquilosante, osteoartritis, y artritis reumatoide), enfermedad de Behcet, enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), psoriasis, dermatitis atópica, y dermatitis de contacto son dolencias frecuentes y problemáticas. El TNF- α desempeña un papel central en la respuesta inflamatoria, y la administración de sus antagonistas bloquea las respuestas crónicas y agudas en modelos animales de enfermedad inflamatoria. La producción aumentada o no regulada de TNF- α se ha implicado en varias enfermedades, por ejemplo espondilitis anquilosante, enfermedad de Behcet, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, y colitis ulcerosa.
- 15 La fosfodiesterasa tipo 4 (PDE4) pertenece a una familia de isoenzimas denominadas fosfodiesterasas de nucleótidos cílicos (PDE). Se cree que el mecanismo celular primario para la inactivación de cAMP es la degradación de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) por PDE. Se ha demostrado que la inhibición de PDE4 es particularmente eficaz en la inhibición de la liberación de mediadores inflamatorios.
- 20 Ningún tratamiento para una enfermedad diagnosticada es 100% eficaz en todas las poblaciones de pacientes que padecen la enfermedad. Por ejemplo, en el ensayo de estudio más grande, etanercept produjo una tasa de respuesta del 57% en comparación con el 22% para el placebo después de 24 semanas (la respuesta se determinó mediante los criterios de respuesta ASAS 20 validados desarrollados por el Assessments in Ankylosing Spondylitis [ASAS] Working Group). véase McCormack et al., BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy 18 (3): 199-205 (2003). Por consiguiente, todavía existe una necesidad significativa de métodos precisos y sensibles para identificar pacientes con diversas enfermedades o trastornos inflamatorios que probablemente respondan a un tratamiento. Los marcadores séricos que predicen la respuesta clínica a los anticuerpos anti-TNF en pacientes con espondilitis anquilosante se describen en documento WO 2010/077722 A1.
- 25 **2. SUMARIO**
- 30 La invención se expone en el conjunto anexo de reivindicaciones. Se proporcionan aquí métodos para identificar a un sujeto que padece una enfermedad o trastorno, por ejemplo espondilitis anquilosante, que es probable que responda a un tratamiento con apremilast, o para predecir la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno, por ejemplo espondilitis anquilosante, a un tratamiento con apremilast. También se proporciona aquí apremilast para uso en métodos para tratar a un paciente que es probable que responda a apremilast.
- 35 En un aspecto, se proporcionan aquí métodos para identificar a un sujeto que tiene espondilitis anquilosante que es probable que responda a un tratamiento con apremilast, o para predecir la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene espondilitis anquilosante a un tratamiento con apremilast, que comprenden:
- 40 (a) medir el nivel de proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP1) en una muestra del sujeto; y
- 45 (b) diagnosticar que es probable que el sujeto responda a apremilast si el nivel de MCP1 en la muestra es menor que un nivel umbral de MCP1.
- 50 En algunos aspectos de la descripción, los métodos proporcionados aquí comprenden además administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de apremilast al sujeto diagnosticado con probabilidad de responder a apremilast.
- 55 En otro aspecto, se proporciona aquí apremilast para uso en métodos para tratar un sujeto que tiene espondilitis anquilosante, que comprenden:
- 60 (a) identificar al sujeto que tiene espondilitis anquilosante que puede responder a un tratamiento con apremilast, que comprende:
- 65 (i) medir el nivel de MCP1 en una muestra del sujeto; y
- 70 (ii) diagnosticar que es probable que el sujeto responda a apremilast si el nivel de MCP1 en la muestra es menor que un nivel umbral de MCP1. y
- 75 (b) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de apremilast si se identifica que es probable que el sujeto responda al tratamiento con apremilast.
- 80 En algunas realizaciones, el nivel umbral de MCP1 se determina basándose en los niveles de MCP1 en una población. En algunas realizaciones, el nivel umbral de MCP1 está entre 200 pg/ml y 50 pg/ml. En algunas realizaciones, el nivel

umbral de MCP1 está entre 105 pg/ml y 70 pg/ml. En algunas realizaciones, el nivel umbral de MCP1 es menor que 200 pg/ml, 150 pg/ml, 120 pg/ml, 105 pg/ml, 100 pg/ml, 95 pg/ml, 90 pg/ml, 85 pg/ml, 80 pg/ml, 75 pg/ml o 70 pg/ml. En algunas realizaciones, el nivel umbral de MCP1 es alrededor de 105 pg/ml. En algunas realizaciones, el nivel umbral de MCP1 es alrededor de 95 pg/ml. En algunas realizaciones, el nivel umbral de MCP1 es alrededor de 75 pg/ml.

En algunas realizaciones, se diagnostica que el sujeto tiene más de un 50% a un 90% de probabilidad de responder a apremilast si el nivel de MCP1 es menor que el nivel umbral de MCP1. En otras realizaciones, se diagnostica que el sujeto tiene más de un 50% de probabilidad de responder a apremilast si el nivel de MCP1 es menor que el nivel umbral de MCP1. En aún otras realizaciones, se diagnostica que el sujeto tiene más de un 60% de probabilidad de responder a apremilast si el nivel de MCP1 es menor que el nivel umbral de MCP1. En aún otras realizaciones, se diagnostica que el sujeto tiene más de un 70% de probabilidad de responder a apremilast si el nivel de MCP1 es menor que el nivel umbral de MCP1. En aún otras realizaciones, se diagnostica que el sujeto tiene más de un 80% de probabilidad de responder a apremilast si el nivel de MCP1 es menor que el nivel umbral de MCP1. En aún otras realizaciones, se diagnostica que el sujeto tiene más de un 90% de probabilidad de responder a apremilast si el nivel de MCP1 es menor que el nivel umbral de MCP1.

3. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las FIGS. 1A-1D muestran que un grupo de pacientes (agrupamiento 4 o grupo de bajo MCP1) identificado en función del perfil de expresión de biomarcadores está asociado con la capacidad de respuesta a un tratamiento con apremilast. La FIG. 1A muestra resultados de agrupamiento sin supervisión con perfiles de biomarcadores e identificación de un grupo de pacientes (agrupamiento 4) con mayor tasa de respuesta al tratamiento con apremilast. La FIG. 1B muestra que el agrupamiento 4 está asociado significativamente con la capacidad de respuesta a apremilast. La FIG. 1C muestra que la tasa de respuesta al tratamiento con apremilast es significativamente mayor en el grupo de pacientes de bajo MCP1 en el estudio ASAS20. La FIG. 1D muestra que la tasa de respuesta al tratamiento con apremilast es significativamente mayor en el grupo de pacientes de bajo MCP1 en el estudio ASAS40.

Las FIGS. 2A-2F muestran el uso del nivel de MCP1 solo para clasificar a un paciente con el fin de predecir la respuesta del paciente a un tratamiento con apremilast. La FIG. 2A muestra que los pacientes del grupo de pacientes del agrupamiento 4 tienen un nivel de expresión de MCP1 significativamente menor en comparación con el resto de los pacientes. La FIG. 2B muestra que el nivel de MCP1 se usó para diferenciar un subgrupo de pacientes (14% de la población total) altamente sensible a apremilast (en el brazo de apremilast con 20 mg o 30 mg de apremilast), con una tasa de respuesta de alrededor de 62,5%. La FIG. 2C muestra que el nivel de MCP1 diferencia un subgrupo de pacientes (20% del brazo de apremilast 30 mg) con una tasa de respuesta al tratamiento con 30 mg de apremilast de alrededor de 66,6%. La FIG. 2D muestra la distribución de MCP1 usando un nivel umbral (103,97 pg/ml) calculado en base al valor mediano de MCP1 de la población total. La FIG. 2E muestra la distribución de MCP1 usando el umbral calculado como el punto medio entre la mediana del bajo MCP1 y la mediana de no bajo MCP1 en todos los pacientes. La FIG. 2F muestra la distribución de MCP1 usando el nivel umbral calculado como la media de los umbrales obtenida a partir de una validación cruzada de 10 veces.

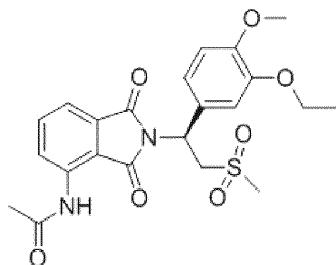
Las FIGS. 3A-3E muestran el uso de niveles de expresión de múltiples biomarcadores para clasificar a un paciente con el fin de predecir la respuesta del paciente a un tratamiento con apremilast. La FIG. 3A muestra la sensibilidad y la AUC de dos clasificadores - Bayes naive y RSVM ponderado. La FIG. 3B muestra una gráfica de distribución de pacientes basada en los niveles de expresión de los 2 primeros biomarcadores (MCP1 e interleucina-15) identificados en el presente estudio. La FIG. 3C muestra una gráfica de distribución de pacientes basada en los niveles de expresión de los 5 primeros biomarcadores (MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de matriz, y antagonista del receptor de interleucina-1) identificados en el presente estudio. La FIG. 3D muestra una gráfica de distribución de pacientes basada en los niveles de expresión de los 10 primeros biomarcadores (MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, eotaxina-1, alfa-1-antitripsina, proteína 1 beta inflamatoria de macrófagos, y molécula 1 de adhesión celular vascular) identificados en el presente estudio. La FIG. 3E muestra una gráfica de distribución de pacientes basada en los niveles de expresión de los 49 biomarcadores proporcionados en el presente estudio.

4. DESCRIPCIÓN DETALLADA

4.1 Definiciones

Como se usa aquí, el término "apremilast" se refiere a (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolin-1,3-diona (también conocida como N-[2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etyl]-2,3-dihidro-1,3-dioxo-1H-isoindol-4-il]acetamida), o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, hidrato, cocristal, clatrato, un polimorfo, estereoisómero, o isotópologo de la misma. Se cree que el enantiómero activo de apremilast es el enantiómero (+). La estructura de (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolin-1,3-

diona, también conocida como N-[2-[(1S)-1-(3-etoxy-4-metoxifénil)-2-(metilsulfonil)etil]-2,3-dihidro-1,3-dioxo-1H-isoindol-4-il]acetamida, es:



que se puede preparar según los métodos descritos en las Patentes U.S. Nos. 6,962,940; 7,208,516; 7,427,638; o 7,893,101.

Como se usa aquí, los términos "compuesto" y "compuesto de tratamiento" se usan indistintamente, e incluyen apremilast.

Como se usa aquí, y a menos que se indique lo contrario, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" incluye, pero no se limita a, sales preparadas a partir de ácidos o bases no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo ácidos y bases inorgánicos y ácidos y bases orgánicos. Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables adecuadas proporcionadas aquí incluyen sales metálicas hechas de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio, y zinc, o sales orgánicas hechas de lisina, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina), y procaína. Los ácidos no tóxicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácidos inorgánicos y orgánicos, tales como ácidos acético, algínico, antranílico, bencenosulfónico, benzoico, canforsulfónico, cítrico, etenosulfónico, fórmico, fumárico, galacturónico, glucónico, glucurónico, glutámico, glicólico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, mucico, nítrico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fosfórico, propiónico, salicílico, esteárico, succínico, sulfánilico, sulfúrico, tartárico, y p-toluenosulfónico. Los ácidos no tóxicos específicos incluyen los ácidos clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, sulfúrico, y metanosulfónico. De este modo, los ejemplos de sales específicas incluyen sales de hidrocloruro y mesilato.

Como se usa aquí y a menos que se indique lo contrario, el término "hidrato" significa un compuesto proporcionado aquí o una sal del mismo que incluye además una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de agua unida por fuerzas intermoleculares no covalentes.

Como se usa aquí y a menos que se indique lo contrario, el término "solvato" significa un solvato formado a partir de la asociación de una o más moléculas de disolvente a un compuesto proporcionado aquí. El término "solvato" incluye hidratos (por ejemplo, monohidrato, dihidrato, trihidrato, o tetrahidrato).

Como se usa aquí y a menos que se indique lo contrario, el término "polimorfo" significa formas cristalinas sólidas de un compuesto proporcionado aquí, o un complejo del mismo. Diferentes polimorfos del mismo compuesto pueden exhibir diferentes propiedades físicas, químicas y/o espectroscópicas.

Como se usa aquí y a menos que se especifique lo contrario, el término "profármaco" significa un derivado de un compuesto que se puede hidrolizar, oxidar, o reaccionar de otro modo en condiciones biológicas (*in vitro* o *in vivo*) para proporcionar el compuesto. Los ejemplos de profármacos incluyen, pero no se limitan a, derivados y metabolitos de apremilast que incluyen restos biohidrolizables, tales como amidas biohidrolizables, ésteres biohidrolizables, carbamatos biohidrolizables, carbonatos biohidrolizables, ureidos biohidrolizables, y análogos de fosfato biohidrolizables.

Como se usa aquí, y a menos que se especifique lo contrario, el término "enantiómero", "isómero" o "estereoisómero" abarca todos los compuestos enantiomérica/estereoméricamente puros y enantiomérica/estereoméricamente enriquecidos proporcionados aquí.

Como se usa aquí, ya menos que se indique lo contrario, la expresión "estereoméricamente puro" o "enantioméricamente puro" significa que un compuesto comprende un estereoisómero y está sustancialmente libre de su contraestereoisómero o enantiómero. Por ejemplo, un compuesto es estereomérica o enantioméricamente puro cuando el compuesto contiene mayor o igual a 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de un estereoisómero, y 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o menos del estereoisómero contrario. "Sustancialmente libre de su enantiómero (R)" está abarcado por la expresión estereoméricamente puro o enantioméricamente puro.

También debe tenerse en cuenta que los compuestos pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos. Por ejemplo, los compuestos pueden marcarse radiactivamente con isótopos radiactivos, tal como por ejemplo tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I), azufre-35 (^{35}S), o carbono-14 (^{14}C), o pueden estar

- enriquecidos isotópicamente, tal como con deuterio (^2H), carbono-13 (^{13}C), o nitrógeno-15 (^{15}N). Como se usa aquí, un “isotopólogo” es un compuesto enriquecido isotópicamente. La expresión “enriquecido isotópicamente” se refiere a un átomo que tiene una composición isotópica distinta de la composición isotópica natural de ese átomo. “Enriquecido isotópicamente” también puede referirse a un compuesto que contiene al menos un átomo que tiene una composición isotópica distinta de la composición isotópica natural de ese átomo. La expresión “composición isotópica” se refiere a la cantidad de cada isótopo presente para un átomo dado. Los compuestos radiomarcados y enriquecidos isotópicamente son útiles como agentes terapéuticos, por ejemplo agentes terapéuticos para el cáncer y la inflamación, reactivos de investigación, por ejemplo reactivos de ensayo de unión, y agentes de diagnóstico, por ejemplo agentes de formación de imágenes in vivo. Se pretende que todas las variaciones isotópicas de los compuestos descritos aquí, ya sean radiactivas o no, estén incluidas dentro del alcance de las realizaciones proporcionadas aquí. En algunas realizaciones, se proporcionan isotopólogos de los compuestos, por ejemplo los isotopólogos son compuestos enriquecidos con deuterio, carbono-13 o nitrógeno-15.
- Como se usa aquí, y a menos que se especifique lo contrario, los términos “tratar”, “tratando” y “tratamiento” contemplan una acción que ocurre mientras un paciente padece la enfermedad o trastorno especificado, que reduce la gravedad o los síntomas de la enfermedad o trastorno, o retrasa o ralentiza la progresión o los síntomas de la enfermedad o trastorno.
- Como se usa aquí, a menos que se especifique lo contrario, los términos “prevenir”, “previniendo” y “prevención” contemplan una acción que ocurre antes de que un paciente comience a sufrir la enfermedad o trastorno especificado, que inhibe o reduce la gravedad o los síntomas de la enfermedad o trastorno.
- Como se usa aquí, y a menos que se indique lo contrario, los términos “manejar”, “manejando” y “manejo” abarcan la prevención de la recurrencia de la enfermedad o trastorno especificado en un paciente que ya ha padecido la enfermedad o trastorno, y/o el alargamiento del tiempo que un paciente que ha padecido la enfermedad o trastorno permanece en remisión. Los términos abarcan modular el umbral, desarrollo y/o duración de la enfermedad o trastorno, o cambiar la forma en que un paciente responde a la enfermedad o trastorno.
- Como se usa aquí, y a menos que se especifique lo contrario, la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” de un compuesto es una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de una enfermedad o trastorno, o para retrasar o minimizar uno o más síntomas asociados con la presencia de la enfermedad o trastorno. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto significa una cantidad de agente terapéutico, solo o en combinación con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de la enfermedad o trastorno. La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” puede abarcar una cantidad que mejora la terapia global, reduce o evita los síntomas o causas de una enfermedad o trastorno, o mejora la eficacia terapéutica de otro agente terapéutico. La expresión también se refiere a la cantidad de un compuesto que es suficiente para provocar la respuesta biológica o médica de una molécula biológica (por ejemplo una proteína, enzima, ARN, o ADN), célula, tejido, sistema, animal, o ser humano, que está siendo buscada por un investigador, veterinario, médico, o clínico.
- La expresión “capacidad de respuesta” o “respuesta”, cuando se usa en referencia a un tratamiento, se refiere al grado de efectividad del tratamiento para reducir o disminuir los síntomas de una enfermedad que se está tratando. Por ejemplo, la expresión “mayor capacidad de respuesta”, cuando se usa en referencia a un tratamiento de una célula o un sujeto, se refiere a un aumento en la efectividad para reducir o disminuir los síntomas de la enfermedad cuando se mide usando cualquier método conocido en la técnica. En ciertas realizaciones, el aumento de la eficacia es al menos alrededor de 5%, al menos alrededor de 10%, al menos alrededor de 20%, al menos alrededor de 30%, al menos alrededor de 40%, o al menos alrededor de 50%. Una mejora en la enfermedad o trastorno se puede caracterizar como una respuesta completa o parcial. “Respuesta completa” se refiere a la ausencia de enfermedad clínicamente detectable. “Respuesta parcial” se refiere a una disminución de al menos alrededor de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% en cualquier síntoma de la enfermedad. El término “tratamiento” contempla una respuesta tanto completa como parcial.
- El término “probabilidad” o “probable” se refiere generalmente a un aumento en la probabilidad de un evento.
- El término “predecir” generalmente significa determinar o afirmar de antemano. Cuando se usa para “predecir” la eficacia de un tratamiento, por ejemplo, el término “predecir” puede significar que la probabilidad del resultado del tratamiento se puede determinar al principio, antes de que haya comenzado el tratamiento, o antes de que el período de tratamiento haya avanzado sustancialmente.
- Como se usan aquí, los términos “polipéptido” y “proteína”, como se usan indistintamente aquí, se refieren a un polímero de aminoácidos de tres o más aminoácidos en una matriz en serie, unidos mediante enlaces peptídicos. El término “polipéptido” incluye proteínas, fragmentos de proteínas, análogos de proteínas, y oligopéptidos. El término polipéptido, como se usa aquí, también puede referirse a un péptido. Los aminoácidos que forman el polipéptido pueden ser de origen natural, o pueden ser sintéticos. El polipéptido se puede purificar a partir de una muestra biológica. El polipéptido, proteína o péptido también incluye polipéptidos, proteínas y péptidos modificados, por ejemplo un glicopolipéptido, glicoproteína o glicopéptido; o un lipopolipéptido, lipoproteína o lipopéptido.

- 5 El término "anticuerpo" se usa aquí en el sentido más amplio, y cubre anticuerpos completamente ensamblados, fragmentos de anticuerpos que retienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, Fv, y otros fragmentos), anticuerpos monocatenarios, diacuerpos, quimeras de anticuerpos, anticuerpos híbridos, anticuerpos biespecíficos, y anticuerpos humanizados. El término "anticuerpo" cubre tanto los anticuerpos policlonales como los monoclonales. El término "anticuerpo" e "inmunoglobulina" o "Ig" se pueden usar indistintamente aquí. Los anticuerpos proporcionados aquí incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos sintéticos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos producidos de forma recombinante, anticuerpos multiespecíficos (incluyendo anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos químéricos, intracuerpos, Fv monocatenarios (scFv) (por ejemplo, incluyendo monoespecíficos, biespecíficos, etc.), anticuerpos camelizados, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv unidos por disulfuro (sdFv), anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id), y fragmentos de unión a epítopo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos proporcionados aquí incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, dominios de unión a antígeno o moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se unen inmunoespecíficamente a un biomarcador proporcionado aquí. Los anticuerpos proporcionados aquí pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), cualquier clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2), o cualquier subclase (por ejemplo, IgG2a e IgG2b) de la molécula de inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, los anticuerpos proporcionados aquí son anticuerpos IgG, o una clase (por ejemplo, IgG1 o IgG4 humana), o una subclase de los mismos.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- El término "expresado" o "expresión", como se usa aquí, se refiere a la transcripción de un gen para dar una molécula de ácido ribonucleico al menos complementaria en parte con una región de una de las dos cadenas de ácido nucleico del gen. El término "expresado" o "expresión", como se usa aquí, también se refiere a la traducción de la molécula de ARN para dar una proteína, un polipéptido, o una porción del mismo.
- Como se usa aquí, el término "nivel" se refiere a la cantidad, acumulación o porcentaje de una molécula de biomarcador. Un nivel se puede representar, por ejemplo, por la cantidad o la tasa de síntesis de un ARN mensajero (ARNm) codificado por un gen, la cantidad o la tasa de síntesis de un polipéptido o proteína codificado por un gen, o la cantidad o la tasa de síntesis de una molécula biológica acumulada en una célula o fluido biológico. El término "nivel" se refiere a una cantidad absoluta de una molécula en una muestra, o a una cantidad relativa de la molécula, determinada en condiciones de estado estacionario o no estacionario. Un ARNm expresado a un mayor nivel puede estar, por ejemplo, presente en un nivel de alrededor de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 90%, 100%, 200%, 300%, 500%, 1.000%, 5.000% o más del nivel de ARNm de control comparativo. Un ARNm expresado a un menor nivel puede estar presente, por ejemplo, en un nivel de alrededor de 99%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 1% o menos del nivel de ARNm de control comparativo. De manera similar, un biomarcador polipeptídico o proteico a un mayor nivel puede estar presente, por ejemplo, a un nivel de alrededor de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 90%, 100%, 200%, 300%, 500%, 1.000%, 5.000% o más del nivel de proteína de control comparativo. Un biomarcador polipeptídico o proteico expresado a un menor nivel puede estar presente, por ejemplo, a un nivel de alrededor de 99%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20 %, 10%, 1% o menos del nivel de proteína de control comparativo.
- Los términos "determinar", "medir", "evaluar", "probar" y "ensayar", como se usan aquí, generalmente se refieren a cualquier forma de medida, e incluyen determinar si un elemento está presente o no. Estos términos incluyen determinaciones tanto cuantitativas como cualitativas. La evaluación puede ser relativa o absoluta. "Evaluar la presencia de" puede incluir determinar la cantidad de algo presente, así como determinar si está presente o ausente.
- Las expresiones "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan indistintamente aquí para describir un polímero de cualquier longitud compuesto de nucleótidos, por ejemplo desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o compuestos producidos sintéticamente, que pueden hibridarse con ácidos nucleicos de origen natural de una manera específica de secuencia, análoga a la de dos ácidos nucleicos naturales, por ejemplo, pueden participar en interacciones de emparejamiento de bases de Watson-Crick. Como se usa aquí, en el contexto de una secuencia polinucleotídica, el término "bases" (o "base") es sinónimo de "nucleótidos" (o "nucleótido"), es decir, la subunidad monomérica de un polinucleótido. Los términos "nucleósido" y "nucleótido" pretenden incluir aquellos restos que contienen no sólo las bases de purina y pirimidina conocidas, sino también otras bases heterocíclicas que han sido modificadas. Tales modificaciones incluyen purinas o pirimidinas metiladas, purinas o pirimidinas aciladas, ribosas alquiladas, u otros heterociclos. Además, los términos "nucleósido" y "nucleótido" incluyen aquellos restos que contienen no sólo azúcares de ribosa y desoxirribosa convencionales, sino también otros azúcares. Los nucleósidos o nucleótidos modificados también incluyen modificaciones en el resto de azúcar, por ejemplo en los que uno o más de los grupos hidroxilo están reemplazados por átomos de halógeno o grupos alifáticos, o están funcionalizados como éteres, aminas, o similares. "Análogos" se refiere a moléculas que tienen características estructurales que se reconocen en la bibliografía como miméticos, derivados, que tienen estructuras análogas, u otros términos similares, e incluyen, por ejemplo, polinucleótidos que incorporan nucleótidos no naturales, miméticos de nucleótidos, tales como nucleósidos modificados en 2', ácidos nucleicos peptídicos, nucleósidos fosfonatos oligoméricos, y cualquier polinucleótido que tenga grupos sustituyentes añadidos, tales como grupos protectores o restos enlazantea.
- Como se usa aquí, el término "complementario" se refiere a la unión específica entre polinucleótidos en base a las secuencias de los polinucleótidos. Como se usa aquí, un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido son

- complementarios si se unen entre sí en un ensayo de hibridación en condiciones rigurosas, por ejemplo si producen un nivel de señal dado o detectable en un ensayo de hibridación. Las porciones de polinucleótidos son complementarias entre sí si siguen las reglas convencionales de emparejamiento de bases, por ejemplo A se empareja con T (o U), y G se empareja con C, aunque pueden estar presentes pequeñas regiones (por ejemplo menos de 5 alrededor de 3 bases) de secuencia de emparejamiento erróneo, de inserción o eliminada.
- Como se usa aquí, la expresión “identidad de secuencia” o “identidad”, en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico, se refiere a los restos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima en una ventana de comparación especificada, y pueden tomar en consideración adiciones, eliminaciones y sustituciones.
- Como se usa aquí, la expresión “identidad sustancial” u “homólogo”, en sus diversas formas gramaticales, en el contexto de polinucleótido, generalmente significa que un polinucleótido comprende una secuencia que tiene una identidad deseada, por ejemplo al menos 60% de identidad, al menos 70% de identidad de secuencia, al menos 80%, al menos 90%, o al menos 95%, en comparación con una secuencia de referencia. Otra indicación de que las secuencias nucleotídicas son sustancialmente idénticas es si dos moléculas se hibridan entre sí en condiciones rigurosas.
- Como se usa aquí, los términos “aislado” y “purificado” se refieren al aislamiento de una sustancia (tal como ARNm, anticuerpo o proteína) de manera que la sustancia comprenda una parte sustancial de la muestra en la que reside, es decir, mayor que la que se encuentra típicamente en su estado natural o no aislado. Normalmente, una parte sustancial de la muestra comprende, por ejemplo, más del 1%, más del 2%, más del 5%, más del 10%, más del 20%, más del 50% o más, normalmente hasta alrededor de 90% - 100% de la muestra. Por ejemplo, una muestra de ARNm aislado puede comprender típicamente al menos alrededor de 1% de ARNm total. Las técnicas para purificar polinucleótidos son bien conocidas en la técnica, e incluyen, por ejemplo, electroforesis en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, clasificación de flujo, y sedimentación según la densidad.
- Como se usa aquí, la expresión término “agente de captura” se refiere a un agente que se une a un ARNm o proteína a través de una interacción que es suficiente para permitir que el agente se una a y concentre el ARNm o proteína de una mezcla homogénea.
- Como se usa aquí, el término “sonda” se refiere a un agente de captura que está dirigido a una secuencia de biomarcador de ARNm diana específica. Por consiguiente, cada sonda de un conjunto de sondas tiene un biomarcador de ARNm diana respectivo. Un dúplex de sonda/ARNm diana es una estructura formada por hibridación de una sonda con su biomarcador de ARNm diana.
- Como se usa aquí, la expresión “sonda de ácido nucleico” o “sonda oligonucleotídica” se refiere a un ácido nucleico capaz de unirse a un ácido nucleico diana de una secuencia complementaria, tal como los biomarcadores de ARNm proporcionados aquí, a través de uno o más tipos de enlaces químicos, normalmente a través del apareamiento de bases complementarias, generalmente a través de formación de enlaces de hidrógeno. Como se usa aquí, una sonda puede incluir bases naturales (por ejemplo, A, G, C o T) o modificadas (7-desazaguanosina, inosina, etc.). Además, las bases en una sonda pueden unirse mediante un enlace distinto del enlace fosfodiéster, siempre que no interfiera con la hibridación. Un experto en la técnica entenderá que las sondas pueden unirse a secuencias diana que carecen de complementariedad completa con la secuencia de la sonda, dependiendo de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Las sondas pueden marcarse directamente con isótopos, por ejemplo, cromóforos, lumíforos, cromógenos, o marcarse indirectamente con biotina a la que se puede unir más tarde un complejo de estreptavidina. Al analizar la presencia o ausencia de la sonda, se puede detectar la presencia o ausencia de un biomarcador de ARNm diana de interés.
- Como se usa aquí, la expresión “condiciones de ensayo rigurosas” se refiere a condiciones que son compatibles para producir pares de unión de ácidos nucleicos, por ejemplo sondas y ARNm diana, de complementariedad suficiente para proporcionar el nivel deseado de especificidad en el ensayo al tiempo que son generalmente incompatibles con la formación de pares de unión entre miembros de unión de complementariedad insuficiente para proporcionar la especificidad deseada. La expresión condiciones de ensayo rigurosas generalmente se refiere a la combinación de condiciones de hibridación y lavado.
- Como se usa aquí, un “marcador” o un “resto detectable”, en referencia a un ácido nucleico, se refiere a una composición que, cuando se une con un ácido nucleico, hace que el ácido nucleico sea detectable, por ejemplo, por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoenzimáticos o químicos. Los marcadores de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, isótopos radiactivos, perlas magnéticas, perlas metálicas, partículas coloidales, colorantes fluorescentes, enzimas, biotina, digoxigenina, y haptenos. Un “ácido nucleico o sonda oligonucleotídica marcado” es generalmente aquel que está unido, ya sea covalentemente, a través de un enlazador o un enlace químico, o no covalentemente, a través de enlaces iónicos, fuerzas de van der Waals, atracciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, o enlaces de hidrógeno, a un marcador de manera que se puede detectar la presencia del ácido nucleico o sonda detectando la presencia del marcador unido al ácido nucleico o sonda.

- Como se usa aquí, el término "muestra" se refiere a un material o mezcla de materiales, típicamente, aunque no necesariamente, en forma fluida, que contiene uno o más componentes de interés. "Muestra biológica", como se usa aquí, se refiere a una muestra obtenida de un sujeto biológico, incluyendo muestra de tejido biológico o de origen fluido, obtenida, alcanzada o recolectada *in vivo* o *in situ*. Una muestra biológica también incluye muestras de una 5
región de un sujeto biológico que contiene células o tejidos precancerosos o cancerosos. Tales muestras pueden ser, pero no se limitan a, órganos, tejidos, fracciones y células aislados de un mamífero. Ejemplos de muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, lisado celular, un cultivo celular, una línea celular, un tejido, tejido oral, tejido 10
gastrointestinal, un órgano, un orgánulo, un fluido biológico, una muestra de sangre, una muestra de orina, y una muestra piel.
- Como se usa aquí, un "marcador biológico" o "biomarcador" es una sustancia cuya cantidad o detección indica un 15
estado biológico particular. En otra realización, los biomarcadores se pueden determinar individualmente, o varios biomarcadores se pueden medir simultáneamente. Los biomarcadores ejemplares de la presente solicitud son los descritos en la Sección 4.2 a continuación.
- Como se usa aquí, el término "alrededor de" o "aproximadamente" significa un error aceptable para un valor particular 20
según lo determinado por un experto en la técnica, que depende en parte de cómo se mide o determina el valor. En ciertas realizaciones, el término "alrededor de" o "aproximadamente" significa dentro de 1, 2, 3, o 4 desviaciones estándar. En ciertas realizaciones, el término "alrededor de" o "aproximadamente" significa dentro de 50%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% o 0,05% de un valor o intervalo dado.
- Como se usa aquí, el término "clasificador" se refiere a una función matemática que separa dos o más grupos, cuerpos 25
o distribuciones de datos según los valores con los que se describe cada ejemplo de datos, o un resultado de una función aplicada a esos valores en una manera que puede usarse para asignar nuevos ejemplos de datos a uno o más de los grupos, cuerpos o distribuciones separados.
- Como se usa aquí, los términos "sujeto" y "paciente" se refieren a un animal, incluyendo el ser humano.
- #### **4.2 Métodos para seleccionar pacientes y predecir la capacidad de respuesta**
- La presente descripción se basa, en parte, en el hallazgo de que un grupo de pacientes seleccionados en base a su 30
nivel o niveles de expresión de uno o más biomarcadores tienen una mayor probabilidad de responder a un tratamiento con un inhibidor de PDE4, por ejemplo apremilast. De este modo, aquí se proporcionan ciertos biomarcadores (por ejemplo, una citocina como MCP1) para seleccionar pacientes para un tratamiento con apremilast, o para predecir una 35
respuesta del paciente para un tratamiento con apremilast. También se proporcionan aquí métodos para identificar un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno, predecir la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno, o correlacionar el nivel o niveles de uno o más biomarcadores en una muestra con la probabilidad de que el sujeto sea sensible a un tratamiento con un inhibidor de PDE4.
- En ciertas realizaciones, la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en psoriasis, artritis psoriásica, 40
artritis reumatoide, espondilitis reumatoide, osteoartritis, otras afecciones artríticas, espondiloartropatía axial no radiográfica, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, celiaquía, dermatitis atópica, y esclerosis múltiple. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es una enfermedad inflamatoria crónica. En algunas 45
realizaciones, la enfermedad inflamatoria es espondilitis anquilosante.
- En un aspecto, el nivel de un solo biomarcador se usa para identificar a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno que es probable que responda a un tratamiento con apremilast, o predecir la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno frente a un tratamiento con apremilast. En otro aspecto, los 50
niveles de dos o más biomarcadores se usan para identificar a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno que es probable que responda a un tratamiento con apremilast, o predecir la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno frente a un tratamiento con apremilast.
- Según la presente descripción, el o los niveles de uno o más biomarcadores pueden correlacionarse con la 55
probabilidad de que un sujeto responda a un tratamiento con un inhibidor de PDE4, por ejemplo apremilast. En ciertas realizaciones, la correlación implica asociar el o los niveles de uno o más biomarcadores medidos en una muestra del sujeto con la probabilidad de que un paciente responda al tratamiento con inhibidor de PDE4, también conocido como tasa de respuesta. Por ejemplo, se mide una puntuación umbral (por ejemplo, se mide o calcula un nivel umbral para un biomarcador, o una puntuación compuesta umbral para múltiples biomarcadores) usando uno o más biomarcadores en una población que tiene la enfermedad o trastorno. En base a la puntuación umbral, se identifica un subgrupo de 60
la población de pacientes (por ejemplo, el subgrupo contiene solo aquellos pacientes con una puntuación umbral, por ejemplo un nivel umbral de X). Se calcula la probabilidad de que un paciente de este subgrupo responda al tratamiento con PDE4 (es decir, si el subgrupo contiene 20 pacientes, y 15 de esos pacientes responden al tratamiento, entonces el subgrupo tiene una tasa de respuesta del 75%). El mismo uno o más biomarcadores usados para calcular la puntuación umbral (por ejemplo, el nivel umbral) se miden o calculan en una muestra de un paciente que va a ser diagnosticado o tratado. El o los niveles de biomarcadores del paciente, o el resultado del cálculo basado en los 65
mismos, se compara con la puntuación umbral (por ejemplo, el nivel de umbral de X usado en el ejemplo anterior) y

se correlaciona con la tasa de respuesta calculada del subgrupo, dependiendo de si el o los niveles de biomarcadores del paciente o el resultado del cálculo basado en los que se basa están dentro o fuera de X.

5 En algunas realizaciones, cuando se usa un único biomarcador, la puntuación umbral es un nivel umbral del biomarcador. En la Sección 4.2.1, a continuación, se describe una descripción más detallada del nivel umbral de un único biomarcador.

10 En otras realizaciones, cuando se usan dos o más biomarcadores, la puntuación umbral es una puntuación compuesta umbral basada en los niveles de los dos o más biomarcadores. En la Sección 4.2.2, a continuación, se describe una descripción más detallada de la puntuación compuesta umbral basada en los niveles de dos o más biomarcadores.

4.2.1 Uso de un único biomarcador para identificar a un sujeto que es probable que responda a un inhibidor de PDE4 o predecir la capacidad de respuesta de un sujeto a un tratamiento con un inhibidor de PDE4

15 Como se describe en la Sección 5.1 y 5.2 más abajo, un único biomarcador, por ejemplo, MCP1, puede diferenciar suficientemente un grupo de pacientes con mayor tasa de respuesta al tratamiento con inhibidores de PDE4. Así, en un aspecto, se proporcionan aquí métodos para usar un único biomarcador identificado en la presente descripción, por ejemplo, los enumerados en Tabla 3, para predecir la capacidad de respuesta del paciente a un tratamiento con un inhibidor de PDE4, por ejemplo apremilast.

20 En ciertos aspectos de la descripción, aquí se proporciona un método para identificar a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno que es probable que responda a un tratamiento con apremilast, o para predecir la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno a un tratamiento con apremilast, que comprende:

25 (a) obtener una muestra del sujeto;

(b) medir el nivel de un biomarcador en la muestra; y

30 (c) diagnosticar que el sujeto tiene probabilidades de responder a apremilast si el nivel del biomarcador en la muestra es menor o mayor en comparación con un nivel umbral del biomarcador, o correlacionar el nivel del biomarcador en la muestra con la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con apremilast.

35 En algunos aspectos de la descripción, el biomarcador se selecciona del grupo que consiste en alfa-1-antitripsina, alfa-2-macroglobulina, beta-2-microglobulina, factor neurotrófico derivado del cerebro, proteína C reactiva, complemento C3, eotaxina-1, factor VII, ferritina, fibrinógeno, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, haptoglobina, molécula 1 de adhesión intercelular, interferón gamma, interleucina-1 alfa, interleucina-1 beta, antagonista del receptor de interleucina-1, interleucina-10, interleucina-12 subunidad p40, interleucina-12 subunidad p70, interleucina-15, interleucina-17, interleucina-2, interleucina-23, interleucina-3, interleucina-4, interleucina-5, interleucina-6, interleucina-7, interleucina-8, proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, metaloproteinasa 3 de matriz, metaloproteinasa de matriz-9, MCP1, factor de células madre, proteína RANTES específica de células T, inhibidor tisular de metaloproteininas, factor alfa de necrosis tumoral, factor beta de necrosis tumoral, receptor 2 de necrosis tumoral, molécula 1 de adhesión celular vascular, factor de crecimiento endotelial vascular, proteína de unión a vitamina D, factor de von Willebrand, osteoprotegerina, interleucina-18, activador del receptor del ligando del factor nuclear kappa B (RANKL), y esclerostina.

40 En otros aspectos de la descripción, el biomarcador se selecciona del grupo que consiste en MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, eotaxina-1, alfa-1-antitripsina, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, molécula 1 de adhesión celular vascular, inhibidor tisular de metaloproteininas 1, osteoprotegerina, factor de crecimiento endotelial vascular, alfa-2-macroglobulina, factor neurotrófico derivado del cerebro, molécula 1 de adhesión intercelular, interleucina-18, metaloproteinasa-9 de matriz, y proteína de unión a vitamina D.

45 En una realización, el biomarcador es MCP1. En un aspecto de la descripción, el biomarcador es interleucina-15. En un aspecto de la descripción, el biomarcador es la proteína C reactiva. En un aspecto de la descripción, el biomarcador es metaloproteinasa-3 de la matriz. En un aspecto de la descripción, el biomarcador es un antagonista del receptor de interleucina-1. En un aspecto de la descripción, el biomarcador es el factor de von Willebrand. En un aspecto de la descripción, el biomarcador es eotaxina-1. En un aspecto de la descripción, el biomarcador es alfa-1-antitripsina. En un aspecto de la descripción, el biomarcador es proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta. En un aspecto de la descripción, el biomarcador es molécula 1 de adhesión celular vascular. En un aspecto de la descripción, el biomarcador es inhibidor tisular de metaloproteininas 1. En un aspecto de la descripción, el biomarcador es osteoprotegerina. En un aspecto de la descripción, el biomarcador es factor de crecimiento endotelial vascular. En un aspecto de la descripción, el biomarcador es alfa-2-macroglobulina. En un aspecto de la descripción, el biomarcador es factor neurotrófico derivado del cerebro. En un aspecto de la descripción, el biomarcador es molécula de adhesión intercelular 1. En un aspecto de la descripción, el biomarcador es interleucina-18. En un aspecto de la descripción, el

biomarcador es metaloproteinasa-9 de la matriz. En un aspecto de la descripción, el biomarcador es la proteína de unión a vitamina D.

Como se muestra en la Sección 5.2 a continuación, MCP1 se identifica como el biomarcador que se asocia con el grupo de pacientes con espondilitis anquilosante que tienen una mayor tasa de respuesta a apremilast que el resto de los pacientes con espondilitis anquilosante tratados con apremilast. De este modo, en algunos aspectos específicos de la descripción, se proporciona aquí un método para identificar un sujeto que tiene espondilitis anquilosante que es probable que responda a un tratamiento con apremilast, o para predecir la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene espondilitis anquilosante a un tratamiento con apremilast, que comprende:

10 (a) obtener una muestra del sujeto;

(b) medir el nivel de MCP1 en la muestra; y

15 (c) diagnosticar que el sujeto tiene probabilidades de responder a apremilast si el nivel de MCP1 en la muestra es menor que un nivel umbral de MCP1, o correlacionar el nivel de MCP1 en la muestra con la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con apremilast.

Como se muestra en la Sección 5.1 y en la Tabla 1, ciertos biomarcadores se expresan en un menor nivel en el grupo de pacientes que probablemente respondan al tratamiento con apremilast, tales como MCP1, interleucina-8, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, eotaxina-1, molécula 1 de adhesión celular vascular, interleucina-18, esclerostina, inhibidor tisular de metaloproteínas, y osteoprotegerina. Otros biomarcadores se expresan en mayores niveles en el grupo de pacientes que probablemente respondan al tratamiento con apremilast, tales como factor de von Willebrand, proteína C reactiva, alfa-1-antitripsina, antagonista del receptor de interleucina-1, interleucina-15, fibrinógeno, metaloproteinasa-3 de la matriz, complemento C3, y haptoglobina.

Por lo tanto, en algunos aspectos de la descripción, se determina que es probable que el sujeto responda a apremilast si el nivel del biomarcador en la muestra es menor que el nivel umbral del biomarcador, y el biomarcador es MCP1, interleucina-8, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, eotaxina 1, molécula 1 de adhesión celular vascular, interleucina 18, esclerostina, inhibidor tisular de metaloproteínas, u osteoprotegerina. En una realización específica, el biomarcador es MCP1, y se diagnostica que el sujeto probablemente responda a apremilast si el nivel de MCP1 en la muestra es menor que un nivel umbral de MCP1.

En algunas realizaciones específicas, los métodos comprenden determinar que es probable que el sujeto responda al tratamiento con apremilast si el nivel de MCP1 del paciente es menor que un nivel umbral de MCP1, y el nivel umbral del MCP1 está entre alrededor de 150 pg/ml y alrededor de 70 pg/ml. En otra realización, el nivel umbral de MCP1 está entre alrededor de 110 pg/ml y alrededor de 75 pg/ml. En otras realizaciones, el nivel umbral de MCP1 está entre alrededor de 95 pg/ml y alrededor de 75 pg/ml. En algunas realizaciones, el nivel umbral de MCP1 es alrededor de 105 pg/ml, 95 pg/ml, o 75 pg/ml. En otras realizaciones, el nivel umbral de MCP1 es menor que 70 pg/ml, tal como 65 pg/ml, 60 pg/ml, 55 pg/ml, 50 pg/ml, 45 pg/ml, 40 pg/ml, 30 pg/ml, 25 pg/ml, 20 pg/ml y 10 pg/ml. En una realización específica, el nivel umbral de MCP1 es de alrededor de 105 pg/ml. En otra realización específica, el nivel umbral de MCP1 es de alrededor de 95 pg/ml. En otra realización específica, el nivel umbral de MCP1 es de alrededor de 75 pg/ml.

45 En otros aspectos de la descripción, se determina que es probable que el sujeto responda a apremilast si el nivel del biomarcador en la muestra es mayor que el nivel umbral del biomarcador, y el biomarcador es el factor de Willebrand, proteína C reactiva, alfa-1-antitripsina, antagonista del receptor de interleucina-1, interleucina-15, fibrinógeno, metaloproteinasa 3 de la matriz, complemento C3, o haptoglobina.

50 Cabe señalar que el valor del nivel umbral de un único biomarcador puede afectar la probabilidad de una capacidad de respuesta del paciente al tratamiento con apremilast. En algunas realizaciones, un menor nivel umbral de un único biomarcador se correlaciona con una mayor tasa de respuesta. En otras realizaciones, un mayor nivel de umbral más alto de un único biomarcador se correlaciona con una mayor respuesta.

55 En ciertas realizaciones, se ilustra en la Sección 5.2.1 más abajo, el nivel umbral de un único biomarcador se puede determinar basándose en los niveles del biomarcador en una población de sujetos. En algunas realizaciones, el nivel umbral del biomarcador se calcula como el promedio o mediana de los niveles de biomarcador en la población. En otras realizaciones, el nivel umbral del biomarcador se determina basándose en los niveles del biomarcador de los sujetos que responden o es probable que respondan a apremilast y los niveles del biomarcador de aquellos sujetos que no responden o que probablemente no respondan a apremilast. En una realización más específica, el nivel umbral del biomarcador se determina como el punto medio entre el nivel de la mediana del biomarcador de los pacientes que es probable que respondan a apremilast y el nivel de la mediana del biomarcador de los pacientes que no es probable que respondan a apremilast. En otras realizaciones más, el nivel umbral del biomarcador se calcula como media de umbrales obtenida de la validación cruzada (por ejemplo, validación cruzada de 3, 5 o 10 veces). En otras realizaciones, el nivel umbral del biomarcador se calcula como media de los umbrales obtenida de una validación cruzada de 3, 4, 5, 6, 10, 20 o 50 veces. En una realización, el nivel umbral del biomarcador se calcula como media de los umbrales

- obtenida de una validación cruzada 3 veces. En otras realizaciones, el nivel de umbral del biomarcador se calcula como media de los umbrales obtenidos de una validación cruzada de 4 veces. En aún otras realizaciones, el nivel umbral del biomarcador se calcula como media de los umbrales obtenidos de una validación cruzada de 5 veces. En aún otras realizaciones, el nivel umbral del biomarcador se calcula como media de los umbrales obtenidos de una validación cruzada de 6 veces. En aún otras realizaciones, el nivel umbral del biomarcador se calcula como media de los umbrales obtenidos de una validación cruzada de 10 veces. En aún otras realizaciones, el nivel umbral del biomarcador se calcula como media de los umbrales obtenidos de una validación cruzada de 20 veces. En aún otras realizaciones, el nivel umbral del biomarcador se calcula como media de los umbrales obtenidos de una validación cruzada de 50 veces. El número de veces puede ser mayor que 50, y puede variar según el tamaño de la población.
- En ciertos aspectos de la descripción, se diagnostica que el sujeto tiene más de 50% a 90% de probabilidad de responder a un tratamiento con apremilast, si el nivel del biomarcador es menor o mayor en comparación con el nivel umbral del biomarcador. En un aspecto de la descripción, se diagnostica que el sujeto tiene más del 50% de probabilidad de responder a un tratamiento con apremilast, si el nivel del biomarcador es menor o mayor en comparación con el nivel umbral del biomarcador. En otro aspecto de la descripción, se diagnostica que el sujeto tiene más del 60% de probabilidad de responder a un tratamiento con apremilast, si el nivel del biomarcador es menor o mayor en comparación con el nivel umbral del biomarcador. En otro aspecto de la descripción, se diagnostica que el sujeto tiene más del 70% de probabilidad de responder a un tratamiento con apremilast, si el nivel del biomarcador es menor o mayor en comparación con el nivel umbral del biomarcador. En aún otro aspecto de la descripción, se diagnostica que el sujeto tiene más del 80% de probabilidad de responder a un tratamiento con apremilast, si el nivel del biomarcador es menor o mayor en comparación con el nivel umbral del biomarcador. En aún otro aspecto de la descripción, se diagnostica que el sujeto tiene más del 90% de probabilidad de responder a un tratamiento con apremilast, si el nivel del biomarcador es menor o mayor en comparación con el nivel umbral del biomarcador.
- En algunas realizaciones más específicas, el biomarcador es MCP1, y se diagnostica que el sujeto tiene más de 50% de probabilidad de responder a apremilast si el nivel de MCP1 es menor que el nivel umbral de MCP1. En algunas realizaciones más específicas, el biomarcador es MCP1, y se diagnostica que el sujeto tiene más de 55% de probabilidad de responder a apremilast si el nivel de MCP1 es menor que el nivel umbral de MCP1. En algunas realizaciones más específicas, el biomarcador es MCP1, y se diagnostica que el sujeto tiene más de 60% de probabilidad de responder a apremilast si el nivel de MCP1 es menor que el nivel umbral de MCP1. En algunas realizaciones más específicas, el biomarcador es MCP1, y se diagnostica que el sujeto tiene más de 65% de probabilidad de responder a apremilast si el nivel de MCP1 es menor que el nivel umbral de MCP1. En algunas realizaciones más específicas, el biomarcador es MCP1, y se diagnostica que el sujeto tiene más de 70% de probabilidad de responder a apremilast si el nivel de MCP1 es menor que el nivel umbral de MCP1. En algunas realizaciones más específicas, el biomarcador es MCP1, y se diagnostica que el sujeto tiene más de 80% de probabilidad de responder a apremilast si el nivel de MCP1 es menor que el nivel umbral de MCP1. En algunas realizaciones más específicas, el biomarcador es MCP1, y se diagnostica que el sujeto tiene más de 90% de probabilidad de responder a apremilast si el nivel de MCP1 es menor que el nivel umbral de MCP1.
- 4.2.2 Uso de múltiples biomarcadores para identificar a un sujeto que probablemente responda a un inhibidor de PDE4 o predicción de la capacidad de respuesta de un sujeto a un tratamiento con un inhibidor de PDE4**
- Como se describe en las Secciones 5.1 y 5.3 más abajo, un perfil de expresión de 49 biomarcadores o un subconjunto de los mismos (múltiples biomarcadores) se puede usar para diferenciar un grupo de pacientes que tienen una mayor tasa de respuesta a apremilast. Por ejemplo, la combinación de los 2 primeros biomarcadores identificados en el presente estudio, la combinación de los 5 primeros biomarcadores, la combinación de los 10 primeros biomarcadores, o la combinación de los 49 biomarcadores se puede usar para agrupar un paciente con el fin de predecir la respuesta de un paciente, como se demuestra en la Sección 5.3 y las FIGS. 3B-3E.
- De este modo, también se describen aquí métodos para usar múltiples biomarcadores (dos o más biomarcadores) para identificar un sujeto que es probable que responda a apremilast, o predecir la capacidad de respuesta de un sujeto a un tratamiento con apremilast. En ciertos aspectos de la descripción, aquí se proporciona un método para identificar a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno que es probable que responda a un tratamiento con apremilast, o para predecir la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno a un tratamiento con apremilast, que comprende:
- (a) obtener una muestra del sujeto;
 - (b) medir los niveles de dos o más biomarcadores en la muestra; y
 - (c) correlacionar los niveles de dos o más biomarcadores con la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con apremilast.
- En algunos aspectos de la descripción, se usan 2 a 49 biomarcadores para predecir una respuesta de un paciente. También se contempla cualquier intervalo allí. En un aspecto de la descripción, se usan 2 biomarcadores para predecir una respuesta del paciente. En un aspecto de la descripción, se usan 3 biomarcadores para predecir una respuesta

del paciente. En un aspecto de la descripción, se usan 4 biomarcadores para predecir una respuesta del paciente. En un aspecto de la descripción, se usan 5 biomarcadores para predecir una respuesta del paciente. En otro aspecto de la descripción, se usan 6 biomarcadores para predecir una respuesta del paciente. En otro aspecto de la descripción, se usan 7 biomarcadores para predecir una respuesta del paciente. En aún otro aspecto de la descripción, se usan 8 biomarcadores para predecir una respuesta del paciente. En aún otro aspecto de la descripción, se usan 9 biomarcadores para predecir una respuesta del paciente. En aún otro aspecto de la descripción, se usan 10 biomarcadores para predecir una respuesta del paciente. En aún otro aspecto de la descripción, se usan 49 biomarcadores para predecir una respuesta del paciente.

- 5 10 En algunos aspectos de la descripción, los dos o más biomarcadores se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alfa-1-antitripsina, alfa-2-macroglobulina, beta-2-microglobulina, factor neurotrófico derivado del cerebro, proteína C reactiva, complemento C3, eotaxina-1, factor VII, ferritina, fibrinógeno, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, haptoglobina, molécula 1 de adhesión intercelular, interferón gamma, interleucina-1 alfa, interleucina-1 beta, antagonista del receptor de interleucina-1, interleucina-10, interleucina-12 subunidad p40, interleucina-12 subunidad p70, interleucina-15, interleucina-17, interleucina-2, interleucina-23, interleucina-3, interleucina-4, interleucina-5, interleucina-6, interleucina-7, interleucina-8, proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, metaloproteinasa 3 de matriz, metaloproteinasa de matriz-9, MCP1, factor de células madre, proteína RANTES específica de células T, inhibidor tisular de metaloproteininas, factor alfa de necrosis tumoral, factor beta de necrosis tumoral, receptor 2 del de necrosis tumoral, molécula 1 de adhesión celular vascular, factor de crecimiento endotelial vascular, proteína de unión a vitamina D, factor de von Willebrand, osteoprotegerina, interleucina-18, RANKL, y esclerostina.

15 20 En un aspecto de la descripción, los dos o más biomarcadores se seleccionan independientemente del grupo que consiste en MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, eotaxina-1, alfa-1-antitripsina, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, molécula 1 de adhesión celular vascular, inhibidor tisular de metaloproteininas 1, osteoprotegerina, factor de crecimiento endotelial vascular, alfa-2-macroglobulina, factor neurotrófico derivado del cerebro, molécula 1 de adhesión intercelular, interleucina-18, metaloproteinasa-9 de matriz, y proteína de unión a vitamina D.

25 30 En la presente invención, uno de los dos o más biomarcadores es MCP1; de este modo, en otro aspecto de la descripción, se proporciona aquí un método para identificar a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno que es probable que responda a apremilast, o para predecir la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno a apremilast, que comprende:

- 35 (a) obtener una muestra del sujeto;
 (b) determinar los niveles de dos o más biomarcadores en la muestra, en el que uno de los dos o más biomarcadores es MCP1;
 40 (c) correlacionar los niveles de los dos o más biomarcadores con la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con apremilast.

45 50 En algunas realizaciones, las dos o más citocinas incluyen MCP1 e interleucina-15. De este modo, en algunos aspectos específicos de la descripción, se proporciona aquí un método para identificar a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno que es probable que responda a apremilast, o para predecir la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno a apremilast, que comprende:

- 55 (a) obtener una muestra del sujeto;
 60 (b) determinar los niveles de MCP1 e interleucina-15;
 (c) correlacionar los niveles de MCP1 e interleucina-15 con la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con apremilast.

65 70 En algunas realizaciones, las dos o más citocinas incluyen MCP1, interleucina-15, y proteína C reactiva. De este modo, en algunos aspectos específicos de la descripción, se proporciona aquí un método para identificar a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno que es probable que responda a apremilast, o para predecir la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno a apremilast, que comprende:

- 75 (a) obtener una muestra del sujeto;
 (b) determinar los niveles de MCP1, interleucina-15, y proteína C reactiva;
 80 (c) correlacionar los niveles de MCP1, interleucina-15, y proteína C reactiva con la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con apremilast.

- En otras realizaciones, las dos o más citocinas son MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, y metaloproteinasa 3 de la matriz. De este modo, en algunos aspectos específicos de la descripción, se proporciona aquí un método para identificar a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno que es probable que responda a apremilast, o para predecir la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno a apremilast, que comprende:
- (a) obtener una muestra del sujeto;
- (b) determinar los niveles de MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, y metaloproteinasa 3 de la matriz;
- (c) correlacionar los niveles de MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva y metaloproteinasa 3 de la matriz con la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con apremilast.
- En otras realizaciones, las dos o más citocinas son MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, y antagonista del receptor de interleucina-1. De este modo, en algunos aspectos específicos de la descripción, se proporciona aquí un método para identificar a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno que es probable que responda a apremilast, o para predecir la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno a apremilast, que comprende:
- (a) obtener una muestra del sujeto;
 - (b) determinar los niveles de MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, y antagonista del receptor de interleucina-1;
- (c) correlacionar los niveles de MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, y antagonista del receptor de interleucina-1 con la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con apremilast.
- En aún otras realizaciones, las dos o más citocinas son MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, y factor de von Willebrand. De este modo, en algunos aspectos específicos de la descripción, se proporciona aquí un método para identificar a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno que es probable que responda a apremilast, o para predecir la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno a apremilast, que comprende:
- (a) obtener una muestra del sujeto;
 - (b) determinar los niveles de MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, y factor de von Willebrand;
- (c) correlacionar los niveles de MCP1, interleucina 15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina 1, y factor de von Willebrand con la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con apremilast.
- En aún otras realizaciones, las dos o más citocinas son MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, y eotaxina-1. De este modo, en algunos aspectos específicos de la descripción, se proporciona aquí un método para identificar a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno que es probable que responda a apremilast, o para predecir la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno a apremilast, que comprende:
- (a) obtener una muestra del sujeto;
 - (b) determinar los niveles de MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, y eotaxina-1;
- (c) correlacionar los niveles de MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, y eotaxina-1 con la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con apremilast.
- En aún otras realizaciones, las dos o más citocinas incluyen MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, eotaxina-1 y alfa-1-antitripsina. De este modo, en algunos aspectos específicos de la descripción, se proporciona aquí un método para identificar a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno que es probable que responda a apremilast, o para predecir la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno a apremilast, que comprende:

- (a) obtener una muestra del sujeto;
- (b) determinar los niveles de MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, eotaxina-1, y alfa-1-antitripsina;
- (c) correlacionar los niveles de MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, eotaxina-1, y alfa-1-antitripsina con la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con apremilast.
- 10 En aún otras realizaciones, las dos o más citocinas incluyen MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, eotaxina-1, alfa-1-antitripsina, y proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta. De este modo, en algunos aspectos específicos de la descripción, se proporciona aquí un método para identificar a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno que es probable que responda a apremilast, o para predecir la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno a apremilast, que comprende:
- (a) obtener una muestra del sujeto;
- (b) determinar los niveles de MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, eotaxina-1, alfa-1-antitripsina, y proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta;
- (c) correlacionar los niveles de MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, eotaxina-1, alfa-1-antitripsina, y proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta con la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con apremilast.
- 20 En aún otras realizaciones, las dos o más citocinas incluyen MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, eotaxina-1, alfa-1-antitripsina, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, y molécula 1 de adhesión celular vascular. De este modo, en algunos aspectos específicos de la descripción, se proporciona aquí un método para identificar a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno que es probable que responda a apremilast, o para predecir la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno a apremilast, que comprende:
- 25 (a) obtener una muestra del sujeto;
- (b) determinación de los niveles de MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, eotaxina-1, alfa-1-antitripsina, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, y molécula 1 de adhesión celular vascular;
- 30 (c) correlacionar los niveles de MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, eotaxina-1, alfa-1-antitripsina, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, y molécula 1 de adhesión celular vascular con la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con apremilast.
- 35 (a) obtener una muestra del sujeto;
- (b) determinación de los niveles de MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, eotaxina-1, alfa-1-antitripsina, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, y molécula 1 de adhesión celular vascular;
- 40 (c) correlacionar los niveles de MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, eotaxina-1, alfa-1-antitripsina, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, y molécula 1 de adhesión celular vascular con la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con apremilast.
- 45 En ciertos aspectos de la descripción, la etapa de correlacionar los niveles de los dos o más biomarcadores con la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con apremilast comprende (a) generar una puntuación compuesta umbral basada en los niveles de dos o más biomarcadores medidos en una población que padece la enfermedad o trastorno; y (b) determinar la probabilidad de que un sujeto responda a apremilast comparando la puntuación compuesta umbral con la puntuación compuesta del sujeto.
- 50 En aspectos más específicos de la descripción, la etapa de correlacionar los niveles de los dos o más biomarcadores con la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con apremilast comprende (a) determinar el perfil de expresión de los biomarcadores proporcionados aquí o un subconjunto de los mismos en una muestra biológica de una población de sujetos a los que previamente se les ha administrado apremilast, en la que cada subconjunto de biomarcadores corresponde a biomarcadores expresados diferencialmente por los sujetos; (b) generar una puntuación compuesta para los biomarcadores o el subconjunto de los mismos para cada sujeto de la población; (c) diferenciar los sujetos que responden o es probable que respondan a apremilast de aquellos sujetos que no responden o no es probable que respondan a apremilast; y (d) determinar la capacidad de respuesta a apremilast en base a las puntuaciones compuestas para los sujetos que responden o es probable que respondan a apremilast, y aquellos sujetos que no responden o no es probable que respondan a apremilast.
- 55 En aún otras realizaciones específicas, la etapa de correlacionar los niveles de los dos o más biomarcadores con la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con apremilast comprende (a) determinar el perfil de expresión de los biomarcadores proporcionados aquí o un subconjunto de los mismos en una muestra biológica de una población de sujetos a los que previamente se les ha administrado apremilast, en la que cada subconjunto de biomarcadores

- corresponde a biomarcadores expresados diferencialmente por los sujetos; (b) generar una puntuación compuesta para los biomarcadores o el subconjunto de los mismos para cada sujeto de la población; (c) diferenciar los sujetos que responden o es probable que respondan a apremilast de aquellos sujetos que no responden o no es probable que respondan a apremilast; (d) generar una puntuación compuesta umbral que prediga la capacidad de respuesta de un sujeto a apremilast usando un modelo basado en las puntuaciones compuestas para los sujetos que responden o es probable que respondan a apremilast y aquellos sujetos que no responden o es probable que no respondan a apremilast, y (e) determinar la probabilidad de que un sujeto responda a apremilast comparando la puntuación compuesta umbral con la puntuación compuesta del sujeto.
- 5 En algunas realizaciones, se puede usar un clasificador para correlacionar los niveles de los dos o más biomarcadores con la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con apremilast. En la presente descripción, se puede usar cualquier clasificador que clasifique basándose en dos o más características (es decir, asignando una muestra a un grupo en base a dos o más características de la muestra). En algunas realizaciones, el clasificador es un algoritmo de clasificación supervisado. Ejemplos ilimitados de tales clasificadores incluyen SVM estándar, bosque aleatorio, árboles de decisión, clasificadores basados en reglas, y análisis discriminatorio. También se incluyen en la presente descripción otros clasificadores, conocidos por los expertos en la técnica, que pueden analizar el perfil de expresión de múltiples biomarcadores de una población con a fin de "aprender" un límite de decisión entre los pacientes que es probable que respondan a un compuesto de tratamiento y aquellos pacientes que es probable que no respondan al compuesto de tratamiento.
- 10 En una realización específica, el clasificador es Naive Bayes; y Naive Bayes se usa para clasificar a un paciente en base a los niveles de dos o más biomarcadores. En otra realización específica, el clasificador es RSVM ponderado; y RSVM ponderado se usa para clasificar a un paciente en base a los niveles de dos o más biomarcadores.
- 15 En una realización específica, el clasificador es Naive Bayes; y Naive Bayes se usa para clasificar a un paciente en base a los niveles de dos o más biomarcadores. En otra realización específica, el clasificador es RSVM ponderado; y RSVM ponderado se usa para clasificar a un paciente en base a los niveles de dos o más biomarcadores.
- 20 En una realización específica, el clasificador es Naive Bayes; y Naive Bayes se usa para clasificar a un paciente en base a los niveles de dos o más biomarcadores. En otra realización específica, el clasificador es RSVM ponderado; y RSVM ponderado se usa para clasificar a un paciente en base a los niveles de dos o más biomarcadores.
- 25 Como se explicó en la Sección 5.3, Naive Bayes aprende un modelo probabilístico entre características y pertenencia al agrupamiento que maximiza la probabilidad posterior de los subgrupos observados dadas las características (asumiendo la independencia de todas las características). La fórmula para Naive Bayes es:

$$\hat{y} = \operatorname{argmax}_{k \in \{1, \dots, K\}} p(C_k) \prod_{i=1}^n p(x_i | C_k)$$

- 30 en la que $p(C_k)$ representa la probabilidad general de la clase (pertenencia al agrupamiento de bajo MCP1), K es el número de clases (aquí dos), n es el número de características (número de biomarcadores usados (2 para los 2 primeros, etc.)), x son las propias características, y $p(x_i | C_k)$ es la probabilidad posterior de observar x_i dada la clase C_k .
- 35 SVM (máquina de vectores de soporte) es un clasificador que traza un límite entre los agrupamientos de bajo MCP1 y no bajo MCP1. RSVM ponderado es SVM ponderado reducido. La versión reducida de SVM usa un subconjunto de los datos para mejorar la eficiencia y la generalización del modelo. La versión ponderada equilibra clases de diferentes tamaños. La fórmula de SVM es

$$f(\vec{x}) = \operatorname{sign}(\sum \alpha_i y_i K(\vec{x}_i, \vec{x}) + b)$$

- 40 en la que x_i es una muestra representada por un vector de características, y son todas las muestras, K es una matriz del núcleo que codifica la distancia entre todas las muestras, y_i es la pertenencia al agrupamiento para la muestra i , α es una variable indicadora que describe qué muestras están más cerca del límite de clasificación, y b es una compensación.

- 45 En algunas realizaciones, los niveles de los dos o más biomarcadores se correlacionan con una probabilidad mayor que 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de que el sujeto responda a apremilast. En algunas realizaciones, los niveles de los dos o más biomarcadores se correlacionan con una probabilidad mayor que 50% de que el sujeto responda a apremilast. En una realización, los niveles de los dos o más biomarcadores se correlacionan con una probabilidad mayor que 60% de que el sujeto responda a apremilast. En otra realización, los niveles de los dos o más biomarcadores se correlacionan con una probabilidad mayor que 70% de que el sujeto responda a apremilast. En algunas realizaciones, los niveles de los dos o más biomarcadores se correlacionan con una probabilidad mayor que 80% de que el sujeto responda a apremilast. En una realización, los niveles de los dos o más biomarcadores se correlacionan con una probabilidad mayor que 90% de que el sujeto responda a apremilast.

4.3 Métodos de tratamiento, manipulación o prevención

- 50 En otro aspecto de la descripción, se proporcionan aquí métodos para tratar, gestionar y/o prevenir una enfermedad inflamatoria o trastornos relacionados, que comprenden administrar a un paciente que necesita de tal tratamiento,

gestión o prevención una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un inhibidor de PDE4, por ejemplo apremilast. En un aspecto de la descripción, el método es un método para tratar una enfermedad inflamatoria o un trastorno relacionado. En un aspecto de la descripción, el método es un método para tratar una enfermedad inflamatoria o un trastorno relacionado. En un aspecto de la descripción, el método es un método para gestionar una enfermedad inflamatoria o un trastorno relacionado. En la presente invención, la enfermedad inflamatoria es la espondilitis anquilosante.

En algunas realizaciones, se proporciona aquí apremilast para uso en métodos para tratar con apremilast a un sujeto que se determina que es probable que responda a apremilast. En una realización de apremilast para uso en los diversos métodos proporcionados aquí, los métodos comprenden administrar apremilast al sujeto que se determina que es probable que responda a apremilast usando los métodos proporcionados aquí, por ejemplo los descritos en la Sección 4.2. De este modo, en algunos aspectos de la descripción, se proporciona aquí un método para tratar a un sujeto, que comprende:

(a) identificar al sujeto con una enfermedad o trastorno que puede responder a un tratamiento con apremilast, que comprende:

(i) obtener una muestra del sujeto;

(ii) medir el o los niveles de uno o más biomarcadores en la muestra; y

(iii) correlacionar el o los niveles de uno o más biomarcadores con la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con apremilast; y

(b) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de apremilast si se identifica que es probable que el sujeto responda al tratamiento con apremilast.

En algunas realizaciones, se usa un único biomarcador para predecir la respuesta de un paciente. En un aspecto de la descripción, el biomarcador se seleccionan del grupo que consiste en alfa-1-antitripsina, alfa-2-macroglobulina, beta-2-microglobulina, factor neurotrófico derivado del cerebro, proteína C reactiva, complemento C3, eotaxina-1, factor VII, ferritina, fibrinógeno, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, haptoglobina, molécula 1 de adhesión intercelular, interferón gamma, interleucina-1 alfa, interleucina-1 beta, antagonista del receptor de interleucina-1, interleucina-10, interleucina-12 subunidad p40, interleucina-12 subunidad p70, interleucina-15, interleucina-17, interleucina-2, interleucina-23, interleucina-3, interleucina-4, interleucina-5, interleucina-6, interleucina-7, interleucina-8, proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, metaloproteinasa 3 de matriz, metaloproteinasa de matriz-9, MCP1, factor de células madre, proteína RANTES específica de células T, inhibidor tisular de metaloproteininas, factor alfa de necrosis tumoral, factor beta de necrosis tumoral, receptor 2 del de necrosis tumoral, molécula 1 de adhesión celular vascular, factor de crecimiento endotelial vascular, proteína de unión a vitamina D, factor de von Willebrand, osteoprotegerina, interleucina-18, RANKL, y esclerostina.

En otro aspecto de la descripción, el biomarcador se selecciona del grupo que consiste en MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, eotaxina-1, alfa-1-antitripsina, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, molécula 1 de adhesión celular vascular, inhibidor tisular de metaloproteininas 1, osteoprotegerina, factor de crecimiento endotelial vascular, alfa-2-macroglobulina, factor neurotrófico derivado del cerebro, molécula 1 de adhesión intercelular, interleucina-18, metaloproteinasa-9 de matriz, y proteína de unión a vitamina D.

En la presente invención, el biomarcador es MCP1. En un aspecto de la descripción, el biomarcador es interleucina-15. En otro aspecto de la descripción, el biomarcador es la proteína C reactiva. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es metaloproteinasa-3 de la matriz. En un aspecto de la descripción, el biomarcador es un antagonista del receptor de interleucina-1. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es el factor de von Willebrand. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es eotaxina-1. En un aspecto de la descripción, el biomarcador es alfa-1-antitripsina. En otro un aspecto de la descripción, el biomarcador es proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es molécula 1 de adhesión celular vascular. En un aspecto de la descripción, el biomarcador es inhibidor tisular de metaloproteininas 1. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es osteoprotegerina. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es factor de crecimiento endotelial vascular. En un aspecto de la descripción, el biomarcador es alfa-2-macroglobulina. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es factor neurotrófico derivado del cerebro. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es molécula de adhesión intercelular 1. En un aspecto de la descripción, el biomarcador es interleucina-18. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es metaloproteinasa-9 de la matriz. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es la proteína de unión a vitamina D.

En algunos aspectos de la descripción, se diagnostica que es probable que el sujeto responda a apremilast si el nivel del biomarcador en la muestra es menor que el nivel umbral del biomarcador, y el biomarcador es MCP1, interleucina-8, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, eotaxina 1, molécula 1 de adhesión celular vascular, interleucina 18,

esclerostina, inhibidor tisular de metaloproteinasas, u osteoprotegerina. En la presente invención, el biomarcador es MCP1, y se diagnostica que es probable que el sujeto responda al compuesto de tratamiento si el nivel de MCP1 en la muestra es menor que n nivel umbral de MCP1.

- 5 En otros aspectos de la descripción, se diagnostica que es probable que el sujeto responda a apremilast si el nivel del biomarcador en la muestra es mayor que el nivel umbral del biomarcador, y el biomarcador es el factor de Willebrand, proteína C reactiva, alfa-1-antitripsina, antagonista del receptor de interleucina-1, interleucina-15, fibrinógeno, metaloproteinasa 3 de la matriz, complemento C3, o haptoglobina.
- 10 En otra realización, el nivel umbral del biomarcador se determina en base a los niveles del biomarcador en una población de sujetos. En otras algunas realizaciones, el nivel umbral del biomarcador se calcula como el promedio o mediana de los niveles de biomarcador en la población. En otras realizaciones, el nivel umbral del biomarcador se determina en base a los niveles del biomarcador de los sujetos que responden a apremilast y los niveles del biomarcador de aquellos sujetos que no responden a apremilast. En una realización más específica, el nivel umbral del biomarcador se determina como el punto medio entre el nivel de la mediana del biomarcador de los pacientes que es probable que respondan a apremilast y el nivel de la mediana del biomarcador de los pacientes que no es probable que respondan a apremilast. En otras realizaciones más, el nivel umbral del biomarcador se calcula como media de umbrales obtenida de la validación cruzada (por ejemplo, validación cruzada de 3, 5 o 10 veces). También se incluyen en la presente descripción otros métodos estadísticos comúnmente usados para la clasificación en base a una característica conocida por los expertos en la técnica.
- 15
- 20

En algunas realizaciones específicas, los métodos comprenden determinar que es probable que el sujeto responda al tratamiento con apremilast si el nivel de MCP1 del paciente es menor que un nivel umbral de MCP1, y el nivel umbral del MCP1 está entre alrededor de 150 pg/ml y alrededor de 70 pg/ml. En otra realización, el nivel umbral de MCP1

- 25 está entre alrededor de 110 pg/ml y alrededor de 75 pg/ml. En otras realizaciones, el nivel umbral de MCP1 está entre alrededor de 95 pg/ml y alrededor de 75 pg/ml. En algunas realizaciones, el nivel umbral de MCP1 es alrededor de 105 pg/ml, 95 pg/ml, o 75 pg/ml. En otras realizaciones, el nivel umbral de MCP1 es menor que 70 pg/ml, tal como 65 pg/ml, 60 pg/ml, 55 pg/ml, 50 pg/ml, 45 pg/ml, 40 pg/ml, 30 pg/ml, 25 pg/ml, 20 pg/ml y 10 pg/ml. En una realización específica, el nivel umbral de MCP1 es de alrededor de 105 pg/ml. En otra realización específica, el nivel umbral de MCP1
- 30
- 35
- 40
- 45

En ciertos aspectos de la descripción, se diagnostica que el sujeto tiene más de 50% a 90% de probabilidad de responder a un tratamiento con apremilast, si el nivel del biomarcador es menor o mayor en comparación con el nivel umbral del biomarcador. En un aspecto de la descripción, se diagnostica que el sujeto tiene más del 50% de probabilidad de responder a un tratamiento con apremilast, si el nivel del biomarcador es menor o mayor en comparación con el nivel umbral del biomarcador. En otro aspecto de la descripción, se diagnostica que el sujeto tiene más del 60% de probabilidad de responder a un tratamiento con apremilast, si el nivel del biomarcador es menor o mayor en comparación con el nivel umbral del biomarcador. En otro aspecto de la descripción, se diagnostica que el sujeto tiene más del 70% de probabilidad de responder a un tratamiento con apremilast, si el nivel del biomarcador es menor o mayor en comparación con el nivel umbral del biomarcador. En aún otro aspecto de la descripción, se diagnostica que el sujeto tiene más del 80% de probabilidad de responder a un tratamiento con apremilast, si el nivel del biomarcador es menor o mayor en comparación con el nivel umbral del biomarcador. En aún otro aspecto de la descripción, se diagnostica que el sujeto tiene más del 90% de probabilidad de responder a un tratamiento con apremilast, si el nivel del biomarcador es menor o mayor en comparación con el nivel umbral del biomarcador.

En algunas realizaciones más específicas, el biomarcador es MCP1, y se diagnostica que el sujeto tiene más de 50% de probabilidad de responder a apremilast si el nivel de MCP1 es menor que el nivel umbral de MCP1. En algunas realizaciones más específicas, el biomarcador es MCP1, y se diagnostica que el sujeto tiene más de 55% de probabilidad de responder a apremilast si el nivel de MCP1 es menor que el nivel umbral de MCP1. En algunas realizaciones más específicas, el biomarcador es MCP1, y se diagnostica que el sujeto tiene más de 60% de probabilidad de responder a apremilast si el nivel de MCP1 es menor que el nivel umbral de MCP1. En algunas realizaciones más específicas, el biomarcador es MCP1, y se diagnostica que el sujeto tiene más de 65% de probabilidad de responder a apremilast si el nivel de MCP1 es menor que el nivel umbral de MCP1. En algunas realizaciones más específicas, el biomarcador es MCP1, y se diagnostica que el sujeto tiene más de 70% de probabilidad de responder a apremilast si el nivel de MCP1 es menor que el nivel umbral de MCP1. En algunas realizaciones más específicas, el biomarcador es MCP1, y se diagnostica que el sujeto tiene más de 80% de probabilidad de responder a apremilast si el nivel de MCP1 es menor que el nivel umbral de MCP1. En algunas realizaciones más específicas, el biomarcador es MCP1, y se diagnostica que el sujeto tiene más de 90% de probabilidad de responder a apremilast si el nivel de MCP1 es menor que el nivel umbral de MCP1.

Cabe señalar que el valor del nivel umbral de un único biomarcador puede afectar la probabilidad de una capacidad de respuesta del paciente al tratamiento con apremilast. En algunas realizaciones, un menor nivel umbral de un único biomarcador se correlaciona con una mayor tasa de respuesta. En otras realizaciones, un mayor nivel de umbral más alto de un único biomarcador se correlaciona con una mayor respuesta.

- En aspectos de la descripción, se usan dos o más biomarcadores para predecir la respuesta de un paciente. En otro aspecto de la descripción, se usan 2 a 49 biomarcadores para predecir una respuesta de un paciente. En un aspecto de la descripción, se usan 2 biomarcadores para predecir una respuesta del paciente. En algunos aspectos de la descripción, se usan 3 biomarcadores para predecir una respuesta de un paciente. En un aspecto de la descripción, 5 se usan 4 biomarcadores para predecir una respuesta del paciente. En otros aspectos de la descripción, se usan 5 biomarcadores para predecir una respuesta del paciente. En otros aspectos de la descripción, se usan 6 biomarcadores para predecir una respuesta del paciente. En otros aspectos de la descripción, se usan 7 biomarcadores para predecir una respuesta del paciente. En aún otros aspectos de la descripción, se usan 8 biomarcadores para predecir una respuesta del paciente. En aún otros aspectos de la descripción, se usan 9 biomarcadores para predecir una respuesta del paciente. En aún otros aspectos de la descripción, se usan 10 biomarcadores para predecir una respuesta del paciente. En aún otros aspectos de la descripción, se usan 49 biomarcadores para predecir una respuesta del paciente.
- 15 En algunos aspectos de la descripción, los dos o más biomarcadores se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alfa-1-antitripsina, alfa-2-macroglobulina, beta-2-microglobulina, factor neurotrófico derivado del cerebro, proteína C reactiva, complemento C3, eotaxina-1, factor VII, ferritina, fibrinógeno, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, haptoglobina, molécula 1 de adhesión intercelular, interferón gamma, interleucina-1 alfa, interleucina-1 beta, antagonista del receptor de interleucina-1, interleucina-10, interleucina-12 subunidad p40, interleucina-12 subunidad p70, interleucina-15, interleucina-17, interleucina-2, interleucina-23, 20 interleucina-3, interleucina-4, interleucina-5, interleucina-6, interleucina-7, interleucina-8, proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, metaloproteinasa 3 de matriz, metaloproteinasa de matriz-9, MCP1, factor de células madre, proteína RANTES específica de células T, inhibidor tisular de metaloproteininas, factor alfa de necrosis tumoral, factor beta de necrosis tumoral, receptor 2 del de necrosis tumoral, 25 molécula 1 de adhesión celular vascular, factor de crecimiento endotelial vascular, proteína de unión a vitamina D, factor de von Willebrand, osteoprotegerina, interleucina-18, RANKL, y esclerostina.
- 30 En otro aspecto de la descripción, los dos o más biomarcadores se seleccionan independientemente del grupo que consiste en MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, eotaxina-1, alfa-1-antitripsina, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, molécula 1 de adhesión celular vascular, inhibidor tisular de metaloproteininas 1, osteoprotegerina, factor de crecimiento endotelial vascular, alfa-2-macroglobulina, factor neurotrófico derivado del cerebro, molécula 1 de adhesión intercelular, interleucina-18, metaloproteinasa-9 de matriz, y proteína de unión a vitamina D.
- 35 En la presente invención, uno de los dos o más biomarcadores es MCP1. En una realización, los dos o más biomarcadores incluyen MCP1 e interleucina-15. En algunas realizaciones, los dos o más biomarcadores incluyen MCP1, interleucina-15, y proteína C reactiva. En otras realizaciones, los dos o más biomarcadores citocinas son MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, y metaloproteinasa 3 de la matriz. En otras realizaciones, los dos o más biomarcadores son MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, y antagonista del receptor de interleucina-1. En aún otras realizaciones, los dos o más biomarcadores son MCP1, interleucina-15, 40 proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, y factor de von Willebrand. En aún otras realizaciones, los dos o más biomarcadores son MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, y eotaxina-1. En aún otras realizaciones, los dos o más biomarcadores incluyen MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, eotaxina-1 y alfa-45 1-antitripsina. En aún otras realizaciones, los dos o más biomarcadores incluyen MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, eotaxina-1, alfa-1-antitripsina, y proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta. En aún otras realizaciones, los dos o más biomarcadores incluyen MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, eotaxina-1, alfa-1-antitripsina, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, y molécula 1 de adhesión celular vascular.
- 50 En ciertas realizaciones, cuando se usan dos o más biomarcadores, los niveles de los dos o más biomarcadores pueden correlacionarse con la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con apremilast (a) generar una puntuación compuesta umbral basada en los niveles de dos o más biomarcadores medidos en una población que padece la enfermedad o trastorno; y (b) determinar la probabilidad de que un sujeto responda a apremilast comparando la puntuación compuesta umbral con la puntuación compuesta del sujeto.
- 55 En realizaciones más específicas, los niveles de los dos o más biomarcadores pueden correlacionarse con la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con apremilast (a) determinando el perfil de expresión de los biomarcadores proporcionados aquí o un subconjunto de los mismos en una muestra biológica de una población de sujetos a los que previamente se les ha administrado apremilast, en la que cada subconjunto de biomarcadores corresponde a biomarcadores expresados diferencialmente por los sujetos; (b) generar una puntuación compuesta para los biomarcadores o el subconjunto de los mismos para cada sujeto de la población; (c) diferenciar los sujetos que responden o es probable que respondan a apremilast de aquellos sujetos que no responden o no es probable que respondan a apremilast; y (d) determinar la capacidad de respuesta a apremilast en base a las puntuaciones

compuestas para los sujetos que responden o es probable que respondan a apremilast y aquellos sujetos que no responden o no es probable que respondan a apremilast.

- En otras realizaciones más específicas, los niveles de los dos o más biomarcadores pueden correlacionarse con la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con apremilast (a) determinar el perfil de expresión de los biomarcadores proporcionados aquí o un subconjunto de los mismos en una muestra biológica de una población de sujetos a los que previamente se les ha administrado apremilast, en la que cada subconjunto de biomarcadores corresponde a biomarcadores expresados diferencialmente por los sujetos; (b) generar una puntuación compuesta para los biomarcadores o el subconjunto de los mismos para cada sujeto de la población; (c) diferenciar los sujetos que responden o es probable que respondan a apremilast de aquellos sujetos que no responden o no es probable que respondan a apremilast; (d) generar una puntuación compuesta umbral que prediga la capacidad de respuesta de un sujeto a apremilast usando un modelo basado en las puntuaciones compuestas para los sujetos que responden o es probable que respondan a apremilast y aquellos sujetos que no responden o es probable que no respondan a apremilast, y (e) determinar la probabilidad de que un sujeto responda a apremilast comparando la puntuación compuesta umbral con la puntuación compuesta del sujeto.

- En algunas realizaciones, se puede usar un clasificador para correlacionar los niveles de los dos o más biomarcadores con la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con apremilast. En la presente descripción, se puede usar cualquier clasificador que clasifique basándose en dos o más características (es decir, asignando una muestra a un grupo en base a dos o más características de la muestra). En algunas realizaciones, el clasificador es un algoritmo de clasificación supervisado. Ejemplos ilimitados de tales clasificadores incluyen SVM estándar, bosque aleatorio, árboles de decisión, clasificadores basados en reglas, y análisis discriminatorio. También se incluyen en la presente descripción otros clasificadores, conocidos por los expertos en la técnica, que pueden analizar el perfil de expresión de múltiples biomarcadores de una población con a fin de "aprender" un límite de decisión entre los pacientes que es probable que respondan a un compuesto de tratamiento y aquellos pacientes que es probable que no respondan al compuesto de tratamiento.

- En una realización específica, el clasificador es Naive Bayes; y Naive Bayes se usa para clasificar a un paciente en base a los niveles de dos o más biomarcadores. La fórmula para Naive Bayes es:

$$\hat{y} = \operatorname{argmax}_{k \in \{1, \dots, K\}} p(C_k) \prod_{i=1}^n p(x_i | C_k),$$

- en la que $p(C_k)$ representa la probabilidad general de la clase (pertenencia al agrupamiento de bajo MCP1), K es el número de clases (aquí dos), n es el número de características (número de biomarcadores usados (2 para los 2 primeros, etc.)), x son las propias características, y $p(x_i | C_k)$ es la probabilidad posterior de observar x_i dada la clase C_k .

- En otra realización específica, el clasificador es RSVM ponderado; y RSVM ponderado se usa para clasificar a un paciente en base a los niveles de dos o más biomarcadores. RSVM ponderado es SVM ponderado reducido. La versión reducida de SVM usa un subconjunto de los datos para mejorar la eficiencia y la generalización del modelo. La versión ponderada equilibra clases de diferentes tamaños. La fórmula de SVM es

$$f(\vec{x}) = \operatorname{sign}(\sum \alpha_i y_i K(\vec{x}_i, \vec{x}) + b)$$

- en la que x_i es una muestra representada por un vector de características, y son todas las muestras, K es una matriz del núcleo que codifica la distancia entre todas las muestras, y_i es la pertenencia al agrupamiento para la muestra i , α_i es una variable indicadora que describe qué muestras están más cerca del límite de clasificación, y b es una compensación.
- En algunas realizaciones, los niveles de los dos o más biomarcadores se correlacionan con una probabilidad mayor que 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de que el sujeto responda a apremilast. En algunas realizaciones, los niveles de los dos o más biomarcadores se correlacionan con una probabilidad mayor que 50% de que el sujeto responda a apremilast. En una realización, los niveles de los dos o más biomarcadores se correlacionan con una probabilidad mayor que 60% de que el sujeto responda a apremilast. En otra realización, los niveles de los dos o más biomarcadores se correlacionan con una probabilidad mayor que 70% de que el sujeto responda a apremilast. En algunas realizaciones, los niveles de los dos o más biomarcadores se correlacionan con una probabilidad mayor que 80% de que el sujeto responda a apremilast. En una realización, los niveles de los dos o más biomarcadores se correlacionan con una probabilidad mayor que 90% de que el sujeto responda a apremilast.
- En ciertos aspectos de la descripción, la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, espondilitis reumatoide, osteoartritis, otras afecciones artríticas,

espondiloartropatía axial no radiográfica, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, celiaquía, dermatitis atópica, y esclerosis múltiple. En algunos aspectos de la descripción, la enfermedad o trastorno es una enfermedad inflamatoria crónica. En la presente invención, la enfermedad inflamatoria es la espondilitis anquilosante.

- 5 En algunas realizaciones, el paciente es un adulto. En una realización, el paciente es un neonato. En algunas realizaciones, el paciente es un lactante. En otra realización, el paciente es un niño. En una realización, el paciente es un adolescente.
- 10 En ciertas realizaciones, se administran al sujeto alrededor de 5 mg a alrededor de 100 mg de apremilast por día. En una realización, se administran al sujeto alrededor de 10 mg a alrededor de 60 mg de apremilast por día. En algunas realizaciones, apremilast se administra al sujeto una o dos veces al día. En algunas realizaciones, se administran al sujeto alrededor de 5 mg a alrededor de 50 mg de apremilast durante 6 o más días. En una realización, se administran al sujeto alrededor de 10 mg a alrededor de 100 mg de apremilast durante 6 o más días. Debe entenderse que la cantidad específica y la frecuencia de la administración y duración dependerán de la edad del sujeto a tratar, la gravedad y etapa de la enfermedad, y la o las cantidades de cualesquiera segundos agentes activos adicionales opcionales administrados simultáneamente al paciente.

4.4 Métodos para medir niveles de biomarcador

- 20 Los niveles de biomarcadores (por ejemplo, niveles de citocinas) se pueden determinar midiendo los niveles de ARNm o de proteína de los biomarcadores.
- 25 En la técnica se conocen varios métodos para detectar o cuantificar los niveles de ARNm. Los métodos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, transferencias Northern, ensayos de protección de ribonucleasas, y métodos a base de PCR. La secuencia de ARNm de un biomarcador puede usarse para preparar una sonda que es al menos parcialmente complementaria con la secuencia de ARNm. La sonda se puede usar entonces para detectar el ARNm en una muestra, usando cualquier ensayo adecuado, tal como métodos a base de PCR, transferencia Northern, o un ensayo de tira reactiva.
- 30 En otras realizaciones, se puede preparar un ensayo de ácidos nucleicos. Un ensayo típicamente contiene un soporte sólido y al menos un ácido nucleico que está en contacto con el soporte, en el que el ácido nucleico corresponde a al menos una porción de un ARNm de un biomarcador. El ensayo también puede tener un medio para detectar la expresión alterada del ARNm en la muestra.
- 35 El método de ensayo se puede variar dependiendo del tipo de información de ARNm deseada. Los métodos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, transferencias Northern y métodos a base de PCR (por ejemplo, qRT-PCR). Los métodos, tales como qRT-PCR, también pueden cuantificar con precisión la cantidad del ARNm en una muestra.
- 40 Para determinar la presencia y cantidad de ARNm en una muestra, se puede usar cualquier plataforma de ensayo adecuada. Por ejemplo, un ensayo puede tener forma de una tira reactiva, una membrana, un chip, un disco, una tira de ensayo, un filtro, una microesfera, un portaobjetos, una placa de múltiples pocillos, o una fibra óptica. Un sistema de ensayo puede tener un soporte sólido sobre el que se une un ácido nucleico que corresponde al ARNm. El soporte sólido puede comprender, por ejemplo, un plástico, silicio, un metal, una resina, vidrio, una membrana, una partícula, 45 un precipitado, un gel, un polímero, una lámina, una esfera, un polisacárido, un capilar, una película, na placa, o un portaobjetos. Los componentes del ensayo se pueden preparar y envasar juntos como un kit para detectar o medir un ARNm.
- 50 El ácido nucleico puede marcarse, si se desea, para obtener una población de ARNm marcados. En general, una muestra se puede marcar usando métodos que son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, usando ADN ligasa, transferasa terminal, o marcando el esqueleto del ARN, etc.). Véase, por ejemplo, Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology (Wiley & Sons, 3^a ed. 1995); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, N.Y., 3^a ed. 2001). En otra realización, la muestra se marca con marcador fluorescente. Los tintes fluorescentes ejemplares incluyen, pero no se limitan a, tintes de xanteno, tintes de fluoresceína (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), 6-carboxifluoresceína (FAM), 6-carboxi-2',4',7,4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE)), tintes de rodamina (por ejemplo, rodamina 110 (R110), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 5-carboxirrodamina 6G (R6G5 o G5), 6-carboxirrodamina 6G (R6G6 o G6)), tintes de cianina (por ejemplo, Cy3, Cy5 y Cy7), tintes Alexa (por ejemplo, Alexa-fluor-555), cumarina, dietylaminocoumarina, umbelifera, tintes de bencimida (por ejemplo, Hoechst 33258), tintes de fenantridina (por ejemplo, Rojo Texas), tintes de etidio, tintes de acridina, tintes de carbazol, tintes de fenoxazina, tintes de porfirina, tintes de polimetino, tintes BODIPY, tintes de quinolina, pireno, fluoresceína clorotriazinilo, tintes de eosina, tetrametilrodamina, lisamina, y naptolfluoresina.
- 60 En un aspecto de la descripción, las secuencias de ARNm comprenden al menos un ARNm de un biomarcador proporcionado aquí. En algunos aspectos de la descripción, el biomarcador se seleccionan del grupo que consiste en el ARNm de alfa-1-antitripsina, alfa-2-macroglobulina, beta-2-microglobulina, factor neurotrófico derivado del cerebro,

- proteína C reactiva, complemento C3, eotaxina-1, factor VII, ferritina, fibrinógeno, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, haptoglobina, molécula 1 de adhesión intercelular, interferón gamma, interleucina-1 alfa, interleucina-1 beta, antagonista del receptor de interleucina-1, interleucina-10, interleucina-12 subunidad p40, interleucina-12 subunidad p70, interleucina-15, interleucina-17, interleucina-2, interleucina-23, interleucina-3, interleucina-4, interleucina-5, interleucina-6, interleucina-7, interleucina-8, proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, metaloproteinasa 3 de matriz, metaloproteinasa de matriz-9, MCP1, factor de células madre, proteína RANTES específica de células T, inhibidor tisular de metaloproteininas, factor alfa de necrosis tumoral, factor beta de necrosis tumoral, receptor 2 del de necrosis tumoral, molécula 1 de adhesión celular vascular, factor de crecimiento endotelial vascular, proteína de unión a vitamina D, factor de von Willebrand, osteoprotegerina, interleucina-18, RANKL, y esclerostina.
- En una realización específica, el biomarcador es el ARNm de MCP1. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es el ARNm de interleucina-15. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es el ARNm de proteína C reactiva. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es el ARNm de Metaloproteinase-3 de la matriz. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es el ARNm del antagonista del receptor de interleucina-1. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es el ARNm del factor de von Willebrand. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es el ARNm de Eotaxin-1. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es el ARNm de alfa-1-antitripsina. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es el ARNm de la proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es el ARNm de la molécula 1 de adhesión de célula vascular. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es el mRNA del inhibidor tisular de metaloproteininas 1. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es el mRNA de osteoprotegerina. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es el ARNm del factor de crecimiento endotelial vascular. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es el ARNm de alfa-2-macroglobulina. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es el ARNm del factor neurotrófico derivado del cerebro. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es el ARNm de la molécula 1 de adhesión intercelular. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es el ARNm de interleucina-18. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es el ARNm de Metaloproteinase-9 de la matriz. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es el ARNm de la proteína de unión a vitamina D.
- Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en ubicaciones direccionables específicas sobre un soporte sólido, correspondiente cada una a al menos una porción de la secuencia de ARNm de un biomarcador en una célula o un paciente.
- Un método de ensayo de ARNm típico puede contener las etapas de 1) obtener sondas del sujeto unidas a la superficie; 2) hibridar una población de los ARNm a las sondas unidas a la superficie en condiciones suficientes para proporcionar una unión específica; (3) tras la hibridación, lavar para eliminar ácidos nucleicos no unidos específicamente a las sondas unidas a la superficie; y (4) detectar los ARNm hibridados. Los reactivos usados en cada una de estas etapas, y sus condiciones de uso pueden variar según la aplicación en particular.
- La hibridación se puede llevar a cabo en condiciones de hibridación adecuadas, que pueden variar en rigor según se desee. Las condiciones típicas son suficientes para producir complejos de sonda/diana en una superficie sólida entre elementos de unión complementarios, es decir, entre sondas del sujeto unidas a la superficie y ARNm complementarios en una muestra. En ciertas realizaciones, se pueden emplear condiciones de hibridación rigurosas.
- La hibridación se realiza típicamente bajo estrictas condiciones de hibridación. Las técnicas de hibridación estándar (por ejemplo, en condiciones suficientes para proporcionar la unión específica de los ARNm diana en la muestra a las sondas) se describen en Kallioniemi et al., Science 258:818-821 (1992) y en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 93/18186. Se encuentran disponibles varias guías para técnicas generales, por ejemplo, Tijssen, Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parts I and II (Elsevier, Amsterdam 1993). Para descripciones de técnicas adecuadas para hibridaciones *in situ*, véanse Gall et al., Meth. Enzymol. 21:470-480 (1981); Angerer et al., Genetic Engineering: Principles and Methods, Vol 7, págs 43-65 (Plenum Press, Nueva York, Setlow and Hollaender, eds. 1985). La selección de condiciones apropiadas, incluida temperatura, concentración de sal, concentración de polinucleótidos, tiempo de hibridación, y rigurosidad de las condiciones de lavado, dependerán del diseño experimental, incluida la fuente de la muestra, la identidad de los agentes de captura, el grado de complementariedad esperado, etc., y pueden determinarse como una cuestión de experimentación rutinaria para los expertos en la técnica.
- Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que se pueden usar condiciones alternativas pero comparables de hibridación y de lavado para proporcionar condiciones de rigurosidad similar.
- Después del procedimiento de hibridación del ARNm, los polinucleótidos unidos a la superficie se lavan típicamente para eliminar ácidos nucleicos no unidos. El lavado se puede realizar usando cualquier protocolo de lavado conveniente, en el que las condiciones de lavado son típicamente rigurosas, como se describe anteriormente. La hibridación de los ARNm diana a las sondas se detecta entonces usando técnicas estándar.
- También se pueden usar otros métodos, tales como métodos a base de PCR, para detectar o medir la expresión de un biomarcador proporcionado aquí. Los ejemplos de métodos de PCR se pueden encontrar en la patente U.S. No.

6,927,024. Los ejemplos de métodos de RT-PCR se pueden encontrar en la patente U.S. No. 7,122,799. En la patente U.S. No. 7,186,507, se describe un método de PCR fluorescente *in situ*.

- 5 En algunas realizaciones, la PCR con transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR) se puede usar tanto para la detección como para la cuantificación de dianas de ARN (Bustin et al., Clin. Sci. 109:365-379 (2005)). Los resultados cuantitativos obtenidos mediante qRT-PCR son generalmente más informativos que los datos cualitativos. De este modo, en una realización, los ensayos a base de qRT-PCR pueden ser útiles para medir los niveles de ARNm durante los ensayos a base de células. El método de qRT-PCR también es útil para monitorizar la terapia del paciente. Los ejemplos de métodos basados en qRT-PCR, se pueden encontrar, por ejemplo, en la patente U.S. No. 7,101,663.
- 10 10 En contraste con la PCR con transcriptasa inversa normal y el análisis mediante gel de agarosa, qRT-PCR da resultados cuantitativos. Una ventaja adicional de qRT-PCR es la facilidad relativa y la conveniencia de uso. Los instrumentos para qRT-PCR, tales como Applied Biosystems 7500, están disponibles comercialmente, así como los reactivos, tal como TaqMan® Sequence Detection Chemistry. Por ejemplo, se pueden usar los ensayos de expresión génica TaqMan®, siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos kits son ensayos de expresión génica preformulados para la detección y cuantificación rápidas y fiables de transcritos de ARNm de humanos, de ratones, y de ratas. Un programa de qRT-PCR ejemplar es, por ejemplo, 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, después 60°C durante 1 minuto.
- 15 20 Para determinar el número de ciclos en el que la señal de fluorescencia asociada con una acumulación de amplificación particular atraviesa el umbral (denominado C_T), los datos se pueden analizar, por ejemplo, usando el software de Detección de Secuencia del Sistema de PCR en Tiempo Real 7500 v1.3 usando el método de cálculo de cuantificación relativa C_T comparativo. Usando este método, el resultado se expresa como un cambio de veces de los niveles de expresión. En otra realización, el nivel umbral se puede seleccionar para que sea determinado automáticamente por el software. En algunas realizaciones, el nivel umbral se ajusta para que esté por encima de la línea base pero que esté lo suficientemente bajo dentro de la región de crecimiento exponencial de una curva de amplificación.
- 25 30 Para medir el nivel de un biomarcador, se pueden usar varios métodos de detección y cuantificación de proteínas. Se puede usar cualquier método de cuantificación de proteínas adecuado. En una realización, se usan métodos a base de anticuerpos. Los métodos ejemplares que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, inmunotransferencia (transferencia Western), ELISA, inmunohistoquímica, citometría de flujo, matriz de perlas citométricas, y espectroscopía de masas. Normalmente se usan varios tipos de ELISA, incluyendo ELISA directo, ELISA indirecto, y ELISA de sándwich.
- 35 40 45 50 55 60 65 En algunos aspectos de la descripción, el biomarcador se seleccionan del grupo que consiste en la proteína de alfa-1-antitripsina, alfa-2-macroglobulina, beta-2-microglobulina, factor neurotrófico derivado del cerebro, proteína C reactiva, complemento C3, eotaxina-1, factor VII, ferritina, fibrinógeno, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, haptoglobina, molécula 1 de adhesión intercelular, interferón gamma, interleucina-1 alfa, interleucina-1 beta, antagonista del receptor de interleucina-1, interleucina-10, interleucina-12 subunidad p40, interleucina-12 subunidad p70, interleucina-15, interleucina-17, interleucina-2, interleucina-23, interleucina-3, interleucina-4, interleucina-5, interleucina-6, interleucina-7, interleucina-8, proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, metaloproteinasa 3 de matriz, metaloproteinasa de matriz-9, MCP1, factor de células madre, proteína RANTES específica de células T, inhibidor tisular de metaloproteininas, factor alfa de necrosis tumoral, factor beta de necrosis tumoral, receptor 2 de la necrosis tumoral, molécula 1 de adhesión celular vascular, factor de crecimiento endotelial vascular, proteína de unión a vitamina D, factor de von Willebrand, osteoprotegerina, interleucina-18, RANKL, y esclerostina.
- En una realización específica, el biomarcador es la proteína de MCP1. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es la proteína de interleucina-15. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es la proteína de proteína C reactiva. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es la proteína de Metaloproteinase-3 de la matriz. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es la proteína del antagonista del receptor de interleucina-1. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es la proteína del factor de von Willebrand. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es la proteína de Eotaxin-1. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es la proteína de alfa-1-antitripsina. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es la proteína de la proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es la proteína de la molécula 1 de adhesión de célula vascular. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es la proteína del inhibidor tisular de metaloproteininas 1. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es la proteína de osteoprotegerina. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es la proteína del factor de crecimiento endotelial vascular. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es la proteína de alfa-2-macroglobulina. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es la proteína del factor neurotrófico derivado del cerebro. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es la proteína de la molécula 1 de adhesión intercelular. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es la proteína de interleucina-18. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es la proteína de Metaloproteinase-9 de la matriz. En un aspecto específico de la descripción, el biomarcador es la proteína de la proteína de unión a vitamina D.

4.5 Kits para detectar o medir niveles de biomarcadores

- En ciertos aspectos de la descripción, se proporciona aquí un kit para detectar o medir el nivel de ARNm de uno o más biomarcadores. En ciertos aspectos de la descripción, el kit comprende una o más sondas que se unen específicamente a los ARNm del uno o más biomarcadores. En ciertos aspectos de la descripción, el kit comprende además una disolución de lavado. En ciertos aspectos de la descripción, el kit comprende además reactivos para llevar a cabo un ensayo de hibridación, medios para aislar o purificar el ARNm, medios de detección, así como controles positivos y negativos. En ciertos aspectos de la descripción, el kit comprende además una instrucción para usar el kit. El kit se puede personalizar para el uso doméstico, el uso clínico o el uso de investigación.
- Tal kit puede emplear, por ejemplo, una tira reactiva, una membrana, un chip, un disco, una tira de ensayo, un filtro, una microesfera, un portaobjetos, una placa de múltiples pocillos, o una fibra óptica. El soporte sólido del kit puede ser, por ejemplo, un plástico, silicio, un metal, una resina, vidrio, una membrana, una partícula, un precipitado, un gel, un polímero, una lámina, una esfera, un polisacárido, un capilar, una película, una placa, o un portaobjetos. La muestra biológica puede ser, por ejemplo, un cultivo celular, una línea celular, un tejido, un órgano, un orgánulo, un fluido biológico, una muestra de sangre, una muestra de orina, o una muestra de piel.
- En otro aspecto de la descripción, el kit comprende un soporte sólido, ácidos nucleicos unidos al soporte, en el que los ácidos nucleicos son complementarios de al menos 20, 50, 100, 200, 350, o más bases de ARNm, y un medio para detectar la expresión del ARNm en una muestra biológica.
- En un aspecto específico de la descripción, el kit farmacéutico o de ensayo comprende, en un recipiente, un compuesto o una composición farmacéutica del mismo, y comprende además, en uno o más recipientes, componentes para aislar ARN. En otro aspecto específico de la descripción, el kit farmacéutico o de ensayo comprende, en un recipiente, un compuesto o una composición farmacéutica, y comprende además, en uno o más recipientes, componentes para llevar a cabo RT-PCR, qRT-PCR, secuenciación profunda, o micromatrices.
- En ciertos aspectos de la descripción, los kits proporcionados aquí emplean medios para detectar o medir la expresión de un biomarcador mediante PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR), micromatrices, citometría de flujo, o inmunofluorescencia. En otros aspectos de la descripción, la expresión del biomarcador se mide mediante metodologías a base de ELISA u otros métodos similares conocidos en la técnica.
- En otro aspecto específico de la descripción, el kit farmacéutico o de ensayo comprende, en un recipiente, un compuesto o una composición farmacéutica del mismo, y comprende además, en uno o más recipientes, componentes para aislar proteínas. En otro aspecto específico de la descripción, el kit farmacéutico o de ensayo comprende, en un recipiente, un compuesto o una composición farmacéutica, y comprende además, en uno o más recipientes, componentes para realizar citometría de flujo o el ELISA.
- En otro aspecto, se proporcionan aquí kits para medir biomarcadores, que proporcionan materiales necesarios para medir la abundancia de uno o más productos génicos de los biomarcadores o un subconjunto de los biomarcadores (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, o más biomarcadores) proporcionados aquí. Tales kits pueden comprender materiales y reactivos necesarios para medir ARN o proteínas. En otro aspecto de la descripción, tales kits incluyen micromatrices, en los que la micromatriz comprende oligonucleótidos y/o fragmentos de ADN y/o de ARN que se hibridan con uno o más productos génicos de los biomarcadores o un subconjunto de los biomarcadores proporcionados aquí, o cualquier combinación de los mismos. En un aspecto de la descripción, tales kits pueden incluir cebadores para la PCR del producto de ARN o de la copia de ADNc del producto de ARN de los biomarcadores o un subconjunto de los biomarcadores, o ambos. En algunos aspectos de la descripción, tales kits pueden incluir cebadores para la PCR, así como sondas para qPCR. En algunos aspectos de la descripción, tales kits pueden incluir múltiples cebadores y múltiples sondas, en el que algunas de las sondas tienen diferentes fluoróforos para permitir medir simultáneamente múltiples productos génicos de los biomarcadores o un subconjunto de los biomarcadores proporcionados aquí. En un aspecto de la descripción, tales kits pueden incluir además materiales y reactivos para crear ADNc a partir de ARN. En otro aspecto de la descripción, tales kits pueden incluir anticuerpos específicos para los productos proteicos de los biomarcadores o un subconjunto de los biomarcadores proporcionados aquí. Tales kits pueden comprender adicionalmente materiales y reactivos para aislar ARN y/o proteínas de una muestra biológica. Además, tales kits pueden incluir materiales y reactivos para sintetizar ADNc a partir de ARN aislado de una muestra biológica. En algunos aspectos de la descripción, tales kits pueden incluir un producto de programa informático incrustado en un medio legible por ordenador para predecir si un paciente es clínicamente sensible a apremilast. En un aspecto de la descripción, los kits pueden incluir un producto de programa informático incrustado en un medio legible por ordenador, junto con instrucciones.

En algunos aspectos de la descripción, tales kits miden la expresión de uno o más productos de ácido nucleico de los biomarcadores o un subconjunto de los biomarcadores proporcionados aquí. Según este aspecto de la descripción, los kits pueden comprender materiales y reactivos que son necesarios para medir la expresión de productos de ácido

5 nucleico particulares de los biomarcadores o un subconjunto de los biomarcadores proporcionados aquí. Por ejemplo, un kit de micromatrices o de RT-PCR se puede producir para una afección específica y puede contener solo aquellos reactivos y materiales necesarios para medir los niveles de productos específicos del transcripto de ARN de los biomarcadores o un subconjunto de los biomarcadores proporcionados aquí, para predecir si una enfermedad inflamatoria en un paciente es clínicamente sensible a apremilast. Alternativamente, en otro aspecto de la descripción, los kits pueden comprender materiales y reactivos necesarios para medir la expresión de productos de ácido nucleico particulares de genes distintos de los biomarcadores proporcionados aquí. Por ejemplo, en ciertos aspectos de la descripción, los kits comprenden materiales y reactivos necesarios para medir los niveles de expresión de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 48 o más de los genes de los biomarcadores proporcionados aquí, además de reactivos y materiales necesarios para medir los niveles de expresión de al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 48, o más genes distintos de los biomarcadores proporcionados aquí. En otros aspectos de la descripción, los kits contienen reactivos y materiales necesarios para medir los niveles de expresión de al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 48, o más de los genes de los biomarcadores proporcionados aquí. En ciertos aspectos de la descripción, los kits contienen reactivos y materiales necesarios para medir los niveles de expresión de al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 48, o más de los genes de los biomarcadores proporcionados aquí, y 1-10, 1-100, 1-150, 1-200, 1-300, 1-400, 1-500, 1-1000, 25-100, 25-200, 25-300, 25-400, 25-500, 25-1000, 100-150, 100-200, 100-300, 100-400, 100-500, 100-1000 o 500-1000 genes que no son los biomarcadores proporcionados aquí.

30 Para kits de micromatrices de ácido nucleico, los kits generalmente comprenden sondas unidas a una superficie de soporte sólida. En tal aspecto de la descripción, las sondas pueden ser oligonucleótidos o sondas más largas, que incluyen sondas que oscilan de 150 nucleótidos a 800 nucleótidos de longitud. Las sondas se pueden marcar con un marcador detectable. En un aspecto específico de la descripción, las sondas son específicas para uno o más de los productos génicos de los biomarcadores proporcionados aquí. Los kits de micromatrices pueden comprender instrucciones para realizar el ensayo y métodos para interpretar y analizar los datos que resultan de realizar el ensayo. En un aspecto específico de la descripción, los kits comprenden instrucciones para predecir si una enfermedad inflamatoria en un paciente es clínicamente sensible a apremilast. Los kits también pueden comprender reactivos de hibridación y/o reactivos necesarios para detectar una señal producida cuando una sonda se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana. Generalmente, los materiales y reactivos para los kits de micromatrices están en uno o más recipientes. Cada componente del kit está generalmente en su propio recipiente adecuado.

45 En ciertos aspectos de la descripción, un kit de micromatrices de ácido nucleico comprende materiales y reactivos necesarios para medir los niveles de expresión de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 48 o más de los genes de los biomarcadores proporcionados aquí, o una combinación de los mismos, además de los reactivos y materiales necesarios para medir los niveles de expresión de al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, o más genes distintos de aquellos de los biomarcadores proporcionados aquí. En otros aspectos de la descripción, un kit de micromatrices de ácido nucleico contiene reactivos y materiales necesarios para medir los niveles de expresión de al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 48, o más de los genes de los biomarcadores proporcionados aquí, o cualquier combinación de los mismos, y 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 350, 400, 450, o más genes que no son de los biomarcadores proporcionados aquí. En otro aspecto de la descripción, un kit de micromatrices de ácido nucleico contiene reactivos y materiales necesarios para medir los niveles de expresión de al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 48, o más de los genes de los biomarcadores proporcionados aquí, o cualquier combinación de los mismos, y 1-10, 1-100, 1-150, 1-200, 1-300, 1-400, 1-500, 1-1000, 25-100, 25-200, 25-300, 25-400, 25-500, 25-1000, 100-150, 100-200, 100-300, 100-400, 100-500, 100-1000 o 500-1000 genes que no son de los biomarcadores proporcionados aquí.

60 Para la PCR cuantitativa, los kits generalmente comprenden cebadores preseleccionados específicos para secuencias de ácidos nucleicos particulares. Los kits de PCR cuantitativa también pueden comprender enzimas adecuadas para amplificar ácidos nucleicos (por ejemplo, polimerasas, tal como Taq polimerasa), desoxinucleótidos, y amortiguadores necesarios para la reacción de amplificación. Los kits de PCR cuantitativa también pueden comprender sondas específicas para las secuencias de ácidos nucleicos asociadas con o que indican una afección. Las sondas pueden

estar marcadas o no con un fluoróforo. Las sondas pueden estar marcadas o no con una molécula extintora. En un aspecto de la descripción, los kits de PCR cuantitativa también comprenden componentes adecuados para la transcripción inversa de ARN, incluidas enzimas (por ejemplo, transcriptasas inversas, tal como AMV y MMLV) y cebadores para la transcripción inversa junto con desoxinucleótidos y amortiguadores necesarios para la reacción

5 transcripción inversa. Cada componente del kit de PCR cuantitativa está generalmente en su propio recipiente adecuado. De este modo, estos kits generalmente comprenden distintos recipientes adecuados para cada reactivo, enzima, cebador y sonda individuales. Además, los kits de PCR cuantitativa pueden comprender instrucciones para realizar la reacción y métodos para interpretar y analizar los datos que resultan de realizar la reacción. En un aspecto específico de la descripción, los kits contienen instrucciones para predecir si una enfermedad inflamatoria en un paciente es clínicamente sensible a apremilast.

Para kits a base de anticuerpos, el kit puede comprender, por ejemplo: : (1) un primer anticuerpo (que puede estar unido o no a un soporte sólido) que se une a un péptido, polipéptido o proteína de interés; y, opcionalmente, (2) un segundo anticuerpo, diferente, que se une al primer anticuerpo o al péptido, polipéptido, o proteína, y está conjugado a un marcador detectable (por ejemplo, un marcador fluorescente, isótopo radiactivo, o enzima). En un aspecto específico de la descripción, el péptido, polipéptido, o proteína de interés está asociado con o es indicativo de una afección (por ejemplo, una enfermedad). Los kits a base de anticuerpos también pueden comprender perlas para realizar la inmunoprecipitación. Cada componente de los kits a base de anticuerpos está generalmente en su propio recipiente adecuado. De este modo, estos kits generalmente comprenden distintos recipientes adecuados para cada anticuerpo y reactivo. Además, los kits a base de anticuerpos pueden comprender instrucciones para realizar el ensayo y métodos para interpretar y analizar los datos que resultan de realizar el ensayo. En un aspecto específico de la descripción, los kits contienen instrucciones para predecir si una enfermedad inflamatoria en un paciente es clínicamente sensible a apremilast.

25 En algunos aspectos de la descripción, los kits proporcionados aquí comprenden materiales para medir los niveles de expresión de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en alfa-1-antitripsina, alfa-2-macroglobulina, beta-2-microglobulina, factor neurotrófico derivado del cerebro, proteína C reactiva, complemento C3, eotaxina-1, factor VII, ferritina, fibrinógeno, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, haptoglobina, molécula 1 de adhesión intercelular, interferón gamma, interleucina-1 alfa, interleucina-1 beta, antagonista del receptor 30 de interleucina-1, interleucina-10, interleucina-12 subunidad p40, interleucina-12 subunidad p70, interleucina-15, interleucina-17, interleucina-2, interleucina-23, interleucina-3, interleucina-4, interleucina-5, interleucina-6, interleucina-7, interleucina-8, proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, metaloproteinasa 3 de matriz, metaloproteinasa de matriz-9, MCP1, factor de células madre, proteína RANTES 35 específica de células T, inhibidor tisular de metaloproteininas, factor alfa de necrosis tumoral, factor beta de necrosis tumoral, receptor 2 del de necrosis tumoral, molécula 1 de adhesión celular vascular, factor de crecimiento endotelial vascular, proteína de unión a vitamina D, factor de von Willebrand, osteoprotegerina, interleucina-18, RANKL, y esclerostina.

40 En ciertos aspectos de la descripción de los métodos y kits proporcionados aquí, se usan soportes en fase sólida para purificar proteínas, marcar muestras, o realizar los ensayos en fase sólida. Los ejemplos de fases sólidas adecuadas para llevar a cabo los métodos descritos aquí incluyen perlas, partículas, coloides, superficies individuales, tubos, placas de múltiples pocillos, placas de microtitulación, portaobjetos, membranas, geles, y electrodos. Cuando la fase sólida es un material en partículas (por ejemplo, una perla), en un aspecto de la descripción, está distribuido en los pocillos de placas de múltiples pocillos para permitir el procesamiento paralelo de los soportes en fase sólida.

45 Se señala que cualquier combinación de los aspectos enumerados anteriormente de la descripción, por ejemplo con respecto a uno o más reactivos, tal como, sin limitación, cebadores de ácido nucleico, y soporte sólido, también está contemplada con respecto a cualquiera de los diversos métodos y/o kits proporcionados aquí.

50 Ciertas realizaciones de la invención se ilustran mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

5. EJEMPLOS

55 Algunas realizaciones se ilustran mediante los siguientes ejemplos no limitantes. Los ejemplos no deben interpretarse como limitación de su alcance.

5.1 Ejemplo 1 – el agrupamiento no supervisado basado en perfiles de expresión de biomarcadores descubrió un grupo de pacientes con más probabilidad de responder a Apremilast

60 En este ejemplo, un grupo de pacientes con espondilitis anquilosante se identificó, en base al perfil de expresión de 49 biomarcadores, como que tenía más probabilidad de responder a un tratamiento con apremilast. En particular, se usó un panel de biomarcadores del enfoque MAP para la inflamación de Myriad RBM (que tiene 49 biomarcadores) para perfilar 280 muestras de pacientes en el estudio, entre las cuales 255 muestras de pacientes produjeron niveles de biomarcadores medibles. En estas 255 muestras de pacientes, 95 muestras de pacientes se trataron con 20 mg de apremilast ("Grupo del Brazo de Apremilast 20 mg"). Dentro del Grupo del Brazo de Apremilast 20 mg, 36 muestras de pacientes respondieron al tratamiento, y 59 muestras de pacientes no respondieron al tratamiento. 80 muestras de

pacientes Se trataron con 30 mg de apremilast ("Grupo del Brazo de Apremilast 30 mg"). Dentro del Grupo del Brazo de Apremilast 30 mg, 31 muestras de pacientes respondieron al tratamiento, y 49 muestras de pacientes no respondieron al tratamiento. Las 80 muestras restantes de pacientes fueron muestras de control (brazo de placebo).

5 El agrupamiento no supervisado se usó entonces para analizar los perfiles de expresión de biomarcadores para estas
 10 muestras de pacientes en base a los 49 biomarcadores (agrupamiento de consenso/distancia (1-PCor)/método de vinculación de Ward). Estos 49 biomarcadores fueron alfa-1-antitripsina, alfa-2-macroglobulina, beta-2-microglobulina, factor neurotrófico derivado del cerebro, proteína C reactiva, complemento C3, eotaxina-1, factor VII, ferritina, fibrinógeno, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, haptoglobina, molécula 1 de adhesión
 15 intercelular, interferón gamma, interleucina-1 alfa, interleucina-1 beta, antagonista del receptor de interleucina-1, interleucina-10, interleucina-12 subunidad p40, interleucina-12 subunidad p70, interleucina-15, interleucina-17, interleucina-2, interleucina-23, interleucina-3, interleucina-4, interleucina-5, interleucina-6, interleucina-7, interleucina-8, proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, metaloproteinasa 3 de matriz, metaloproteinasa de matriz-9, MCP1, factor de células madre, proteína RANTES específica de células T, inhibidor
 20 tisular de metaloproteinasas, factor alfa de necrosis tumoral, factor beta de necrosis tumoral, receptor 2 del de necrosis tumoral, molécula 1 de adhesión celular vascular, factor de crecimiento endotelial vascular, proteína de unión a vitamina D, factor de von Willebrand, osteoprotegerina, interleucina-18, RANKL, y esclerostina.

25 Los resultados se muestran en la gráfica de la FIG. 1A. Como se muestra, se identificó un grupo de 50 pacientes (agrupamiento 4) como representante de alrededor del 30% de la población total del brazo de tratamiento. Por las razones que se explican en la Sección 5.2 a continuación, este grupo de pacientes se denomina aquí como "grupo de pacientes de bajo MCP1". Como se indica en la FIG. 1B, este agrupamiento de 50 pacientes con espondilitis anquilosante está significativamente asociado con la capacidad de respuesta a apremilast. En particular, dentro de este grupo de 50 pacientes, la tasa de respuesta fue de alrededor de 54%, mayor que la tasa de respuesta en los pacientes restantes, que fue alrededor de 31%.

30 Este grupo de 50 pacientes también comprendió 25 pacientes que recibieron 30 mg de apremilast y 25 pacientes que recibieron 20 mg de apremilast. En cuanto a los brazos de tratamiento individuales, la tasa de respuesta fue incluso más pronunciada en los pacientes que recibieron 30 mg de apremilast. Más específicamente, 16 de 25 de los pacientes que recibieron 30 mg de apremilast, respondieron al tratamiento, lo que produjo una tasa de respuesta de 64%. Esto se compara con la tasa de respuesta de los restantes pacientes en el Grupo de Brazo de Apremilast 30 mg, que fue 27%.

35 **5.2 Ejemplo 2 - uso del nivel de expresión de un único biomarcador, tal como MCP1, para diferenciar un grupo de pacientes que tiene mayor tasa de respuesta de los restantes pacientes**

40 Se llevó a cabo una comparación univariante del nivel de expresión de cada uno de los 49 biomarcadores entre el grupo de pacientes del agrupamiento 4 y los pacientes restantes identificados y descritos en la Sección 5.1 anterior. Solo se usaron poblaciones del brazo de tratamiento. Se excluyó al grupo de placebo. Los resultados representativos se muestran en Tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Comparación de biomarcador individual entre el agrupamiento 4 y el resto de los pacientes

Biomarcador	logFC	AveExpr	adj.P.Val
MCP1	-2,26	-0,13	0,00
Factor de von Willebrand	0,82	0,07	0,00
Interleucina-8	-1,13	0,05	0,00
Proteína C reactiva	0,67	-0,19	0,00
Alfa-1-antitripsina	0,66	-0,01	0,00
Proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta	-0,76	0,09	0,00
Antagonista del receptor de interleucina-1	0,53	-0,19	0,00
Eotaxina-1	-0,36	-0,09	0,00
Interleucina-15	0,48	-0,36	0,01
Fibrinógeno	0,96	-0,12	0,01
Molécula 1 de adhesión celular vascular	-0,51	0,11	0,01
Metaloproteinasa-3 de la matriz	0,51	0,04	0,02
Interleucina-18	-0,41	0,01	0,04
Esclerostina	-0,43	-0,02	0,04

Biomarcador	logFC	AveExpr	adj.P.Val
Complemento C3	0,38	-0,14	0,04
Haptoglobina	0,56	-0,20	0,05
Inhibidor tisular de metaloproteínasas	-0,64	0,21	0,05
Osteoprotegerina	-0,40	0,18	0,09

En la Tabla 1, un valor logFC por debajo de 0 indica un menor nivel de expresión del biomarcador en el grupo de pacientes del agrupamiento 4 en comparación con el resto de pacientes, y un valor logFC por encima de 0 indica un mayor nivel de expresión del biomarcador en el grupo de pacientes del agrupamiento 4 en comparación con resto de los pacientes.

Cada biomarcador se analizó entonces adicionalmente para determinar su asociación con el grupo de pacientes del agrupamiento 4. Se identificó que la citocina MCP1 es capaz de diferenciar más fuertemente el grupo del agrupamiento 4 de los pacientes restantes. Como tal, el grupo de pacientes del agrupamiento 4 se denomina aquí como el “grupo de bajo MCP1” o “agrupamiento de bajo MCP1”. Como se muestra en la FIG. 2A, los pacientes que representan el grupo de bajo MCP1 tenían un nivel de expresión de MCP1 significativamente menor en comparación con el resto de los pacientes tratados. El umbral derivado del punto medio (o promedio) de la mediana del agrupamiento de bajo MCP1 y la mediana de pacientes de no bajo MCP1 fue 93,5 pg/ml (véase la línea discontinua en el panel derecho de la FIG. 2A).

Como se muestra en la FIG. 2B, el nivel de MCP1 se usó para diferenciar un pequeño subgrupo de pacientes (14% de la población total) que responde muy bien a apremilast (en el brazo de apremilast con 20 mg o 30 mg de apremilast), con una tasa de respuesta de alrededor de 62,5%. De forma similar, como se muestra en la FIG. 2C, el nivel de un único biomarcador, MCP1, diferenció un subgrupo de pacientes (20% de brazo de apremilast 30 mg), con una tasa de respuesta al tratamiento con apremilast de 30 mg de alrededor de 66,6%. Como tal, el nivel de un único biomarcador, MCP1, puede usarse para predecir la respuesta del paciente al tratamiento con apremilast.

El rendimiento de usar el nivel de expresión de MCP1 solo como un biomarcador para predecir si un paciente pertenece al agrupamiento 4 (agrupamiento de bajo MCP1) se evaluó mediante validación cruzada. El dato de las muestras se dividió en 10 subconjuntos (10 iteraciones), en el que cada iteración tenía el mismo tamaño y tenía una proporción similar de muestras de bajo MCP1 a muestras de no bajo MCP1. Una iteración (10% del dato) se mantuvo como un conjunto de ensayo, y se aprendió un clasificador a partir del resto del dato (el otro 90%, también denominado el conjunto de entrenamiento). El modelo aprendido se aplicó entonces a los datos de ensayo retenidos para generar predicciones de pertenencia de bajo VCP1 para cada muestra de ensayo, que se comparó entonces con las etiquetas reales de la pertenencia al agrupamiento. Esto generó una estimación no sesgada de cuán bien el clasificador identificaría miembros del agrupamiento de bajo MCP1 en datos futuros y no vistos. El procedimiento se lleva a cabo 10 veces, reteniendo una iteración de ensayo diferente cada vez, y entrenando las 9 iteraciones restantes. Las estadísticas de rendimiento final se calcularon agregando las predicciones sobre todas las iteraciones del ensayo, lo da como resultado predicciones de pertenencia al agrupamiento no sesgadas para todo el conjunto de muestras (todos los pacientes).

Además, dentro de cada conjunto de entrenamiento en el procedimiento anterior (90% de los datos), se llevó a cabo otra ronda de validación cruzada, dividiendo el conjunto de entrenamiento en 10 iteraciones, reteniendo 1 iteración (9% de los datos), y entrenando las 9 iteraciones restantes (81% de los datos). El modelo se entrenó y se ensayó sobre todas las iteraciones internas usando un intervalo de parámetros modelo posibles. Los parámetros óptimos se seleccionaron como aquellos que produjeron el mejor rendimiento de clasificación (según se determina mediante la métrica de AUC) a lo largo de las iteraciones de ensayo de la validación cruzada interna. Finalmente, nuevamente en el bucle exterior de la validación cruzada, el modelo se entrenó en todo el conjunto de entrenamiento (90% de los datos) usando solamente los parámetros óptimos encontrados en el bucle interno. El modelo se aplicó a la iteración del ensayo exterior (10% de los datos), que nunca se utilizó en el proceso de ajuste de parámetros o de construcción de modelo. Este proceso se denomina validación cruzada anidada. En la Tabla 2, a continuación, se muestra el rendimiento de usar MCP1 como un biomarcador.

Tabla 2. Rendimiento de MCP1 como un biomarcador

NB	acc	auc	mcc	sens	spec	ppv	npv
MCP1	0,80	0,83	0,48	0,40	0,97	0,83	0,80

En la Tabla 2, ACC (precisión) indica la proporción de predicciones que el clasificador obtiene correctamente. AUC indica el área bajo la curva, dada una puntuación de clasificación para cada muestra. AUC es la probabilidad de que

una muestra positiva escogida aleatoriamente (una muestra del agrupamiento de bajo MCP1) tendrá una puntuación más alta que una muestra negativa escogida aleatoriamente (una muestra que no procede del agrupamiento de bajo MCP1), es decir, cuando se comparó con la respuesta conocida de los pacientes cuyos puntos de datos se omitieron de la construcción del modelo y posteriormente se predijeron para estimar el rendimiento del clasificador (véanse descripciones anteriores de la validación cruzada). MCC (coeficiente de correlación de matthews) es un coeficiente de correlación entre las clasificaciones observadas y predichas. SENS indica la sensibilidad o tasa de verdaderos positivos, lo que significa la proporción que se clasifica correctamente en todas las muestras de bajo MCP1. SPEC indica la especificidad o tasa de verdaderos negativos, lo que significa la proporción que se clasifica correctamente en todas las muestras de no bajo MCP1. PPV indica el valor predictivo positivo, lo que significa la proporción que se clasifica correctamente de todas las personas que se prevé que estén en el grupo de bajo MCP1. NPV indica el valor predictivo negativo, lo que significa la proporción que se clasifica correctamente de todas las personas que se prevé que no están en el grupo de bajo MCP1.

5.2.1 Determinación de un nivel umbral de MCP1

Un nivel umbral de MCP1 (u otro biomarcador) se puede calcular usando varios métodos. En este estudio se ejemplificaron tres métodos para calcular un nivel umbral de MCP1. La FIG. 2D muestra la distribución de MCP1 usando un nivel umbral (103,97 pg/ml) calculado en base al valor de la mediana de la población total en este estudio.

Cuando el umbral se calculó como el punto medio entre el nivel de MCP1 de la mediana en el grupo de pacientes del agrupamiento 4 y el nivel de VCP1 de la mediana en los pacientes restantes, el nivel umbral fue 93,5 pg/ml. En la FIG. 2E se muestra la distribución de MCP1 usando este nivel umbral. Usando el nivel umbral de 93,5 pg/ml en los brazos de apremilast (brazos tanto de 20 mg como de 30 mg), 36% de los pacientes que recibieron un tratamiento con apremilast se agruparon en el grupo de bajo MCP1, y el grupo de bajo MCP1 tuvo una tasa de respuesta del 49%. Fijándonos solo en el brazo de apremilast 30 mg y usando el mismo nivel umbral de 93,5 pg/ml, 45% de los pacientes que recibieron tratamiento con apremilast de 30 mg se clasificaron en el grupo de bajo MCP1, y estos pacientes tuvieron una tasa de respuesta de 56%.

Un tercer método usado para calcular un nivel umbral de MCP1 fue calculando la media de los umbrales obtenida de la validación cruzada de 10 interacciones (explicado anteriormente). En particular, cada iteración proporcionó un umbral óptimo según la métrica de AUC cuando clasifica para determinar la pertenencia al agrupamiento. Después, se calculó el valor medio de los 10 umbrales. Usando este método, se calculó que el umbral de MCP1 fue 75,63 pg/ml. La distribución de MCP1 en base a este nivel de umbral se muestra en la FIG. 2F. Con este umbral aprendido más restrictivo, la población seleccionada en el grupo de bajo MCP1 disminuyó, mientras aumentó la tasa de respuesta del subgrupo de bajo MCP1. Por ejemplo, en el brazo de 30 mg de apremilast, 22% de los pacientes que recibieron el tratamiento con 30 mg de apremilast se clasificaron en el grupo de bajo MCP1, y estos pacientes tuvieron una mayor tasa de respuesta de 67%.

También se aplicó una evaluación similar a cada uno de los otros biomarcadores. En la Tabla 3 se enumeran (por orden) los biomarcadores principales seleccionados por validación cruzada anidada.

Tabla 3. Biomarcadores principales seleccionados por validación cruzada anidada

Rango	Características de los principales	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	MCP1	8	10	10	10	10	10	10	10	10
2	Interleucina-15	5	7	7	7	10	10	10	10	10
3	Proteína C reactiva	1	5	6	7	8	9	9	10	10
4	Metaloproteinasa-3 de la matriz	1	2	4	6	6	8	10	10	10
5	Antagonista del receptor de interleucina-1	1	1	3	4	6	7	7	8	9
6	Factor de von Willebrand	0	0	1	4	4	6	7	8	9
7	Eotaxina-1	2	3	5	7	7	7	7	8	8
8	Alfa-1-antitripsina	0	0	1	2	3	3	3	4	8
9	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta	1	1	2	2	3	4	5	6	7
10	Molécula 1 de adhesión celular vascular	0	0	0	0	1	3	6	7	7
11	Inhibidor tisular de metaloproteinasas	1	1	1	1	1	2	2	2	2
12	Osteoprotegerina	0	0	0	0	0	0	0	2	2
13	Factor de crecimiento endotelial vascular	0	0	0	0	0	0	2	2	2
14	Alfa-2-macroglobulina	0	0	0	0	0	0	1	1	1

Rango	Características de los principales	2	3	4	5	6	7	8	9	10
15	Factor neurotrófico derivado del cerebro	0	0	0	0	0	0	0	1	1
16	Molécula 1 de adhesión intercelular	0	0	0	0	0	0	0	0	1
17	Interleucina-18	0	0	0	0	1	1	1	1	1
18	Metaloproteinasa-9 de la matriz	0	0	0	0	0	0	0	0	1
19	Proteína de unión a vitamina D	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Cada uno de estos biomarcadores mejor clasificados se puede usar solo para clasificar a un paciente para predecir la respuesta del paciente a un tratamiento con apremilast.

5 5.3 Ejemplo 3 - uso de niveles de expresión de múltiples biomarcadores para diferenciar un grupo de pacientes que tiene una tasa de respuesta más alta del resto de pacientes

10 En este ejemplo se estudió el rendimiento del uso de múltiples biomarcadores para separar un grupo de pacientes con una tasa de respuesta más alta. Se exemplificaron dos clasificadores -Naive Bayes y RSVM ponderado- para clasificar a un paciente en función de los niveles de múltiples biomarcadores.

15 Naive Bayes aprende un modelo probabilístico entre características y pertenencia al agrupamiento que maximiza la probabilidad posterior de los subgrupos observados dadas las características (asumiendo la independencia de todas las características). La fórmula de Naive Bayes es:

$$\hat{y} = \underset{k \in \{1, \dots, K\}}{\operatorname{argmax}} p(C_k) \prod_{i=1}^n p(x_i|C_k),$$

20 en la que $p(C_k)$ representa la probabilidad general de la clase (pertenencia al agrupamiento de bajo MCP1), K es el número de clases (aquí dos), n es el número de características (número de biomarcadores usados, por ejemplo, 2 para los 2 primeros), x son las propias características, y $p(x_i|C_k)$ es la probabilidad posterior de observar x_i dada la clase C_k .

25 SVM (máquina de vectores de soporte) es un clasificador que traza un límite entre los agrupamientos de bajo MCP1 y no bajo VCP1. Las SVM son modelos de aprendizaje supervisado con algoritmos de aprendizaje asociados que analizan datos y reconocen patrones, que se usan para el análisis de clasificación y regresión. Dado un conjunto de ejemplos de entrenamiento, cada uno marcado por pertenecer a una de dos categorías, un algoritmo de entrenamiento de SVM construye un modelo que asigna nuevos ejemplos a una categoría u otra, convirtiéndolo en un clasificador lineal binario no probabilístico. Un modelo de SVM es una representación de los ejemplos como puntos en el espacio, cartografiados de modo que los ejemplos de las categorías separadas estén divididos por un espacio claro lo más amplio posible. Después, los nuevos ejemplos se cartografián en ese mismo espacio, y se predice que pertenecen a una categoría según el lado del espacio en el que caen. RSVM ponderado es SVM ponderado reducido. La versión reducida de SVM usa un subconjunto de los datos para mejorar la eficiencia y la generalización del modelo. La versión ponderada equilibra clases de diferentes tamaños. La fórmula de SVM es

$$35 f(\vec{x}) = \operatorname{sign}(\sum \alpha_i y_i K(\vec{x}_i, \vec{x}) + b)$$

40 en la que x_i es una muestra representada por un vector de características, y son todas las muestras, K es una matriz del núcleo que codifica la distancia entre todas las muestras, y_i es la pertenencia al agrupamiento para la muestra i , α_i es una variable indicadora que describe qué muestras están más cerca del límite de clasificación, y b es una compensación.

45 El rendimiento de estos dos clasificadores para clasificar a los pacientes usando los 2-10 primeros biomarcadores o los 49 biomarcadores se muestra en la FIG. 3A, y se resume en las Tablas 4-5 a continuación.

Tabla 4. Rendimiento de Naive Bayes para la predicción de pertenencia a bajo MCP1

NB	acc	auc	mcc	sens	spec	ppv	npv
2 primeros	0,82	0,87	0,52	0,46	0,96	0,82	0,82
3 primeros	0,83	0,91	0,57	0,48	0,98	0,89	0,82

NB	acc	auc	mcc	sens	spec	ppv	npv
4 primeros	0,84	0,90	0,60	0,62	0,94	0,79	0,86
5 primeros	0,86	0,91	0,63	0,64	0,94	0,82	0,87
6 primeros	0,84	0,90	0,61	0,66	0,92	0,77	0,87
7 primeros	0,84	0,92	0,61	0,70	0,90	0,74	0,88
8 primeros	0,87	0,93	0,67	0,74	0,92	0,79	0,90
9 primeros	0,90	0,94	0,74	0,78	0,94	0,85	0,91
10 primeros	0,91	0,95	0,77	0,82	0,94	0,85	0,93
Todos	0,79	0,89	0,54	0,78	0,80	0,61	0,90

Tabla 5. Rendimiento de RSVM ponderado para la predicción de la pertenencia a bajo MCP1

WRSVM	acc	auc	mcc	sens	spec	ppv	npv
1 primero (MCP1)	0,82	0,74	0,53	0,5	0,95	0,81	0,83
2 primeros	0,79	0,82	0,49	0,66	0,84	0,62	0,86
3 primeros	0,84	0,89	0,61	0,70	0,90	0,74	0,88
4 primeros	0,84	0,91	0,60	0,70	0,90	0,73	0,88
5 primeros	0,86	0,91	0,65	0,74	0,90	0,76	0,90
6 primeros	0,88	0,93	0,70	0,76	0,93	0,81	0,91
7 primeros	0,87	0,94	0,68	0,80	0,90	0,75	0,92
8 primeros	0,90	0,95	0,76	0,80	0,94	0,85	0,92
9 primeros	0,89	0,97	0,74	0,84	0,91	0,79	0,93
10 primeros	0,90	0,97	0,77	0,86	0,92	0,81	0,94
Todos	0,94	0,98	0,85	0,90	0,95	0,88	0,96

- 5 Como se discutió anteriormente, ACC indica la proporción de predicciones que el clasificador obtiene correctamente. La AUC indica la probabilidad de que una muestra positiva escogida aleatoriamente tendrá una puntuación más alta que una muestra negativa escogida aleatoriamente. MCC es un coeficiente de correlación entre las clasificaciones observadas y predichas. SENS indica la sensibilidad o tasa de verdaderos positivos, lo que significa la proporción que se clasifica correctamente en todas las muestras de bajo MCP1. SPEC indica la especificidad o tasa de verdaderos negativos, lo que significa la proporción que se clasifica correctamente en todas las muestras de no bajo MCP1. PPV indica el valor predictivo positivo, lo que significa la proporción que se clasifica correctamente de todas las personas que se prevé que estén en el grupo de bajo MCP1. NPV indica el valor predictivo negativo, lo que significa la proporción que se clasifica correctamente de todas las personas que se prevé que no están en el grupo de bajo MCP1.
- 10 15 Como se muestra en la FIG. 3A y las Tablas 4-5, el rendimiento mejoró a medida que aumentaba el número de biomarcadores. Por ejemplo, la sensibilidad aumentó con el número de biomarcadores para ambos clasificadores.
- 20 25 La identificación de un grupo de pacientes con una tasa de respuesta más alta usando los 2 primeros biomarcadores (MCP1 e interleucina-15) se muestra en la FIG. 3B. La identificación de un grupo de pacientes con mayor tasa de respuesta usando los 5 primeros biomarcadores (MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1) se muestran en la FIG. 3C. La identificación de un grupo de pacientes con mayor tasa de respuesta usando los 10 primeros biomarcadores (MCP1, interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, eotaxina-1, alfa-1-antitripsina, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, y la molécula 1 de adhesión celular vascular) se muestran en FIG. 3D. La identificación de un grupo de pacientes con una mayor tasa de respuesta usando los 49 biomarcadores se muestra en la FIG. 3E. La tasa de respuesta para cada caso se indica en estas figuras.
- 30 Estos resultados indican que el perfil de expresión de estos 49 biomarcadores, o un subconjunto de los mismos (por ejemplo, 2 primeros, 3 primeros, 4 primeros, 5 primeros, 6 primeros, 7 primeros, 8 primeros, 9 primeros, o 10 primeros biomarcadores identificados en el presente estudio) se pueden usar para clasificar a un paciente con el fin de predecir la respuesta del paciente al tratamiento con apremilast.

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para identificar a un sujeto que tiene espondilitis anquilosante que es probable que responda a un tratamiento con apremilast, o para predecir la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene espondilitis anquilosante a un tratamiento con apremilast, que comprenden:

- (a) medir el nivel de proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP1) en una muestra del sujeto; y
- (b) diagnosticar que es probable que el sujeto responda a apremilast si el nivel de MCP1 en la muestra es menor que un nivel umbral de MCP1.

10 2. Apremilast para uso en un método para tratar un sujeto que tiene espondilitis anquilosante, en el que el método comprende:

- 15 (a) identificar al sujeto que tiene espondilitis anquilosante que puede responder a un tratamiento con apremilast, según el método de la reivindicación 1; y

- (b) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de apremilast si se identifica que es probable que el sujeto responda al tratamiento con apremilast.

20 3. El método de la reivindicación 1, o apremilast para uso de la reivindicación 2, en el que el nivel umbral de MCP1 se determina en base a los niveles de MCP1 en una población.

25 4. El método de la reivindicación 1, o apremilast para uso de la reivindicación 2, en el que el nivel umbral de MCP1 se selecciona del grupo que consiste de entre 200 pg/ml a 50 pg/ml y entre 105 pg/ml a 70 pg/ml.

30 5. El método de la reivindicación 1, o apremilast para uso de la reivindicación 2, en el que el nivel umbral de MCP1 es menor que 200 pg/ml, 150 pg/ml, 120 pg/ml, 105 pg/ml, 100 pg/ml, 95 pg/ml, 90 pg/ml, 85 pg/ml, 80 pg/ml, 75 pg/ml o 70 pg/ml.

35 6. El método de la reivindicación 1, o apremilast para uso de la reivindicación 2, en el que el nivel umbral de MCP1 es alrededor de 105 pg/ml.

40 7. El método de la reivindicación 1, o apremilast para uso de la reivindicación 2, en el que el nivel umbral de MCP1 es alrededor de 95 pg/ml.

45 8. El método de la reivindicación 1, o apremilast para uso de la reivindicación 2, en el que el nivel umbral de MCP1 es alrededor de 75 pg/ml.

50 9. El método de la reivindicación 1 o apremilast para uso de la reivindicación 2, en el que se diagnostica que el sujeto tiene más de 50% a 90% de probabilidad de responder a apremilast si el nivel de MCP1 es menor que el nivel umbral de MCP1.

55 10. El método de la reivindicación 1, o apremilast para uso de la reivindicación 2, en el que se diagnostica que el sujeto tiene más de 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de probabilidad de responder a apremilast si el nivel de MCP1 es menor que el nivel de umbral de MCP1.

60 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 10, o apremilast para uso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que el método comprende además:

- 50 (a) medir el nivel de un biomarcador adicional Interleucina-15;

- (b) medir el nivel de dos biomarcadores adicionales que incluyen interleucina-15 y proteína C reactiva; o

- 55 (c) medir el nivel de tres biomarcadores adicionales que incluyen interleucina-15, proteína C reactiva, y metaloproteinasa 3 de la matriz.

60 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 10, o apremilast para uso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que el método comprende además:

- 60 (a) medir el nivel de cuatro biomarcadores adicionales que incluyen interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, y antagonista del receptor de interleucina-1; o

- 65 (b) medir el nivel de cinco biomarcadores adicionales que incluyen interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, y factor de von Willebrand.

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 10, o apremilast para uso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que el método comprende además:

5 (a) medir el nivel de seis biomarcadores adicionales que incluyen interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, y eotaxina-1; o

10 (b) medir el nivel de siete biomarcadores adicionales que incluyen interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, eotaxina-1, y alfa-1-antitripsina.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 10, o apremilast para uso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que el método comprende además:

15 (a) medir el nivel de ocho biomarcadores adicionales que incluyen interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa-3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, eotaxina-1, alfa-1-antitripsina, y proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta; o

20 (b) medir el nivel de nueve biomarcadores adicionales que incluyen interleucina-15, proteína C reactiva, metaloproteinasa 3 de la matriz, antagonista del receptor de interleucina-1, factor de von Willebrand, eotaxina-1, alfa-1-antitripsina, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, y molécula de adhesión de células vasculares-1.

25 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 10, o apremilast para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que el método comprende además medir el nivel de uno o más biomarcadores adicionales seleccionados del grupo que consiste en alfa-1-antitripsina, alfa-2-macroglobulina, beta-2-microglobulina, factor neurotrófico derivado del cerebro, proteína C reactiva, complemento C3, eotaxina-1, factor VII, ferritina, fibrinógeno, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, haptoglobina, molécula 1 de adhesión intercelular, interferón gamma, interleucina-1 alfa, interleucina-1 beta, antagonista del receptor de interleucina-1, interleucina-10, interleucina-12 subunidad p40, interleucina-12 subunidad p70, interleucina-15, interleucina-17, interleucina-2, interleucina-23, interleucina-3, interleucina-4, interleucina-5, interleucina-6, interleucina-7, interleucina-8, proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, metaloproteinasa 3 de matriz, metaloproteinasa de matriz-9, factor de células madre, proteína RANTES específica de células T, inhibidor tisular de metaloproteininas, factor alfa de necrosis tumoral, factor beta de necrosis tumoral, receptor 2 del de necrosis tumoral, molécula 1 de adhesión celular vascular, factor de crecimiento endotelial vascular, proteína de unión a vitamina D, factor de von Willebrand, osteoprotegerina, interleucina-18, RANKL, y esclerostina.

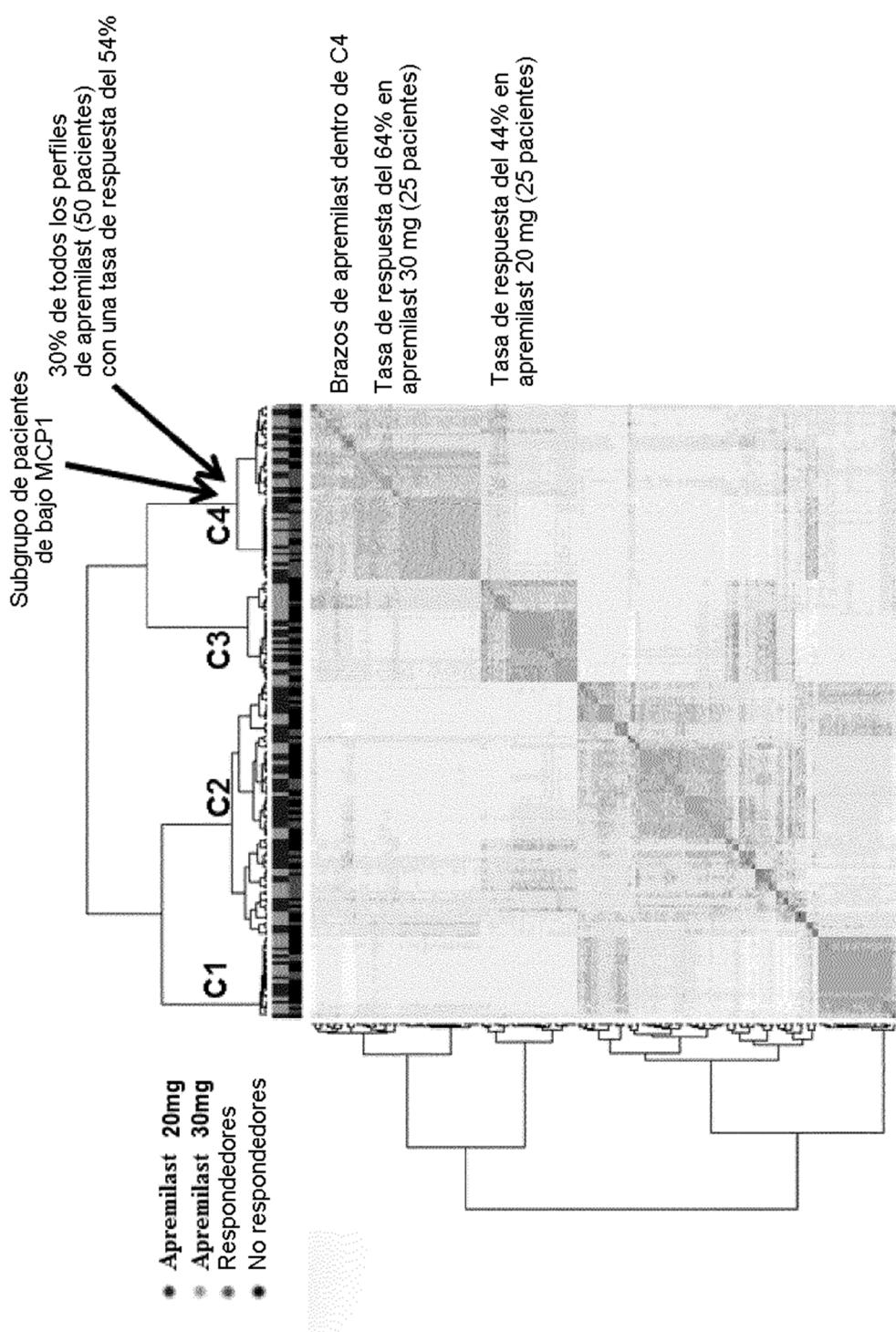


FIG. 1A

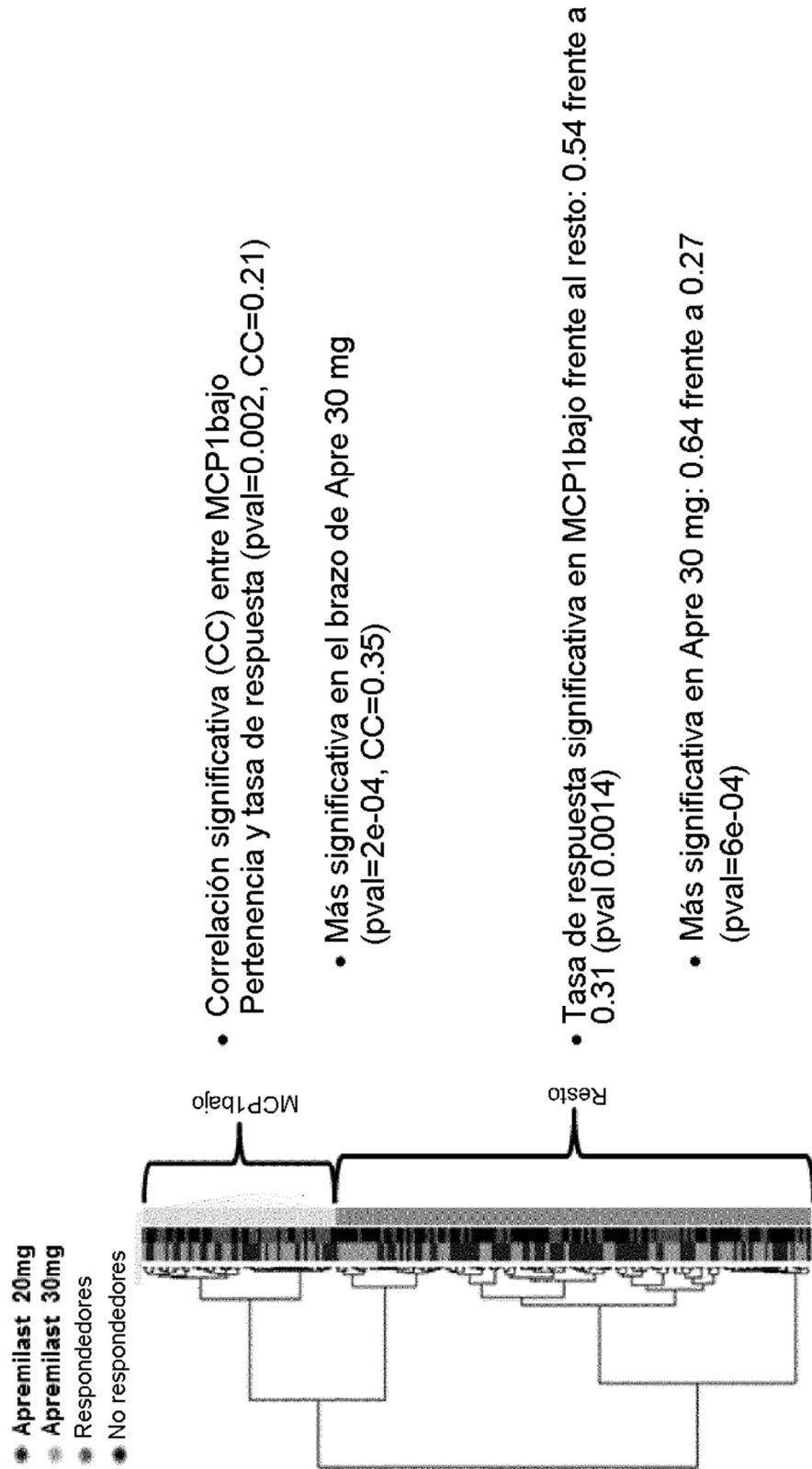
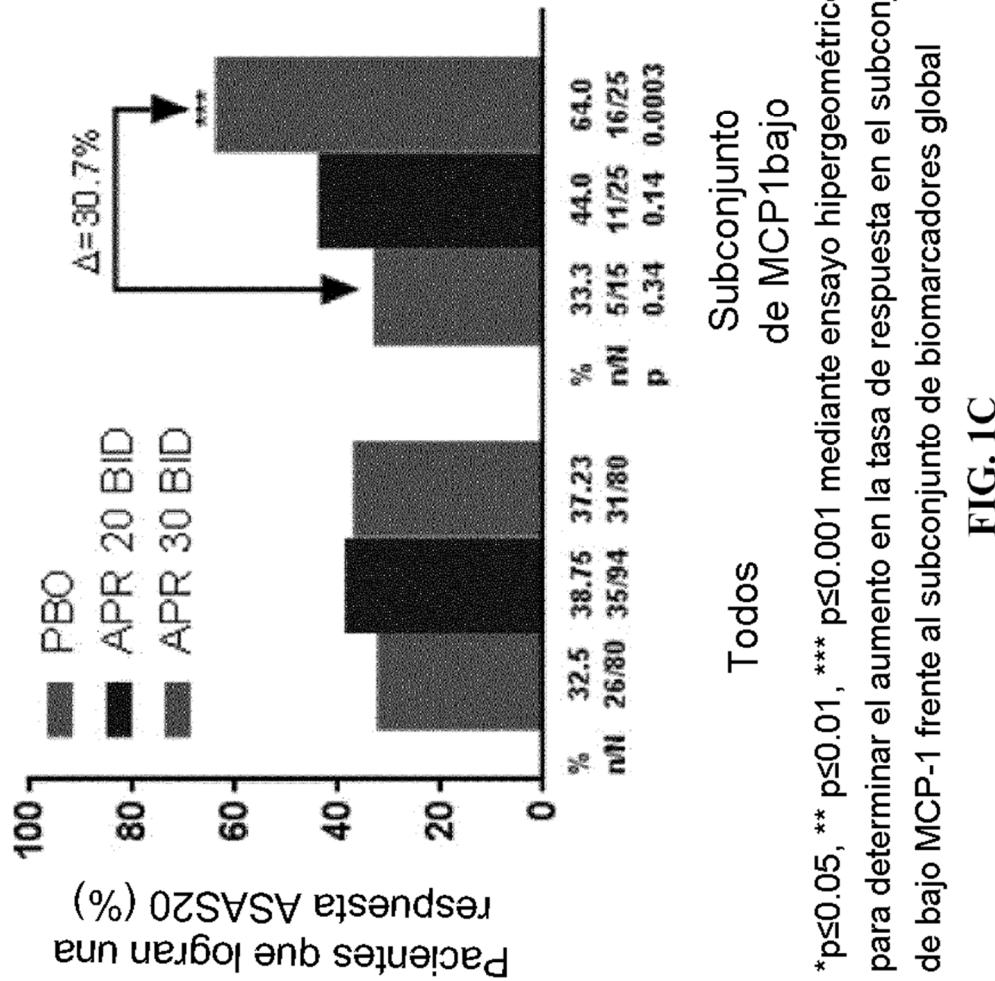


FIG. 1B

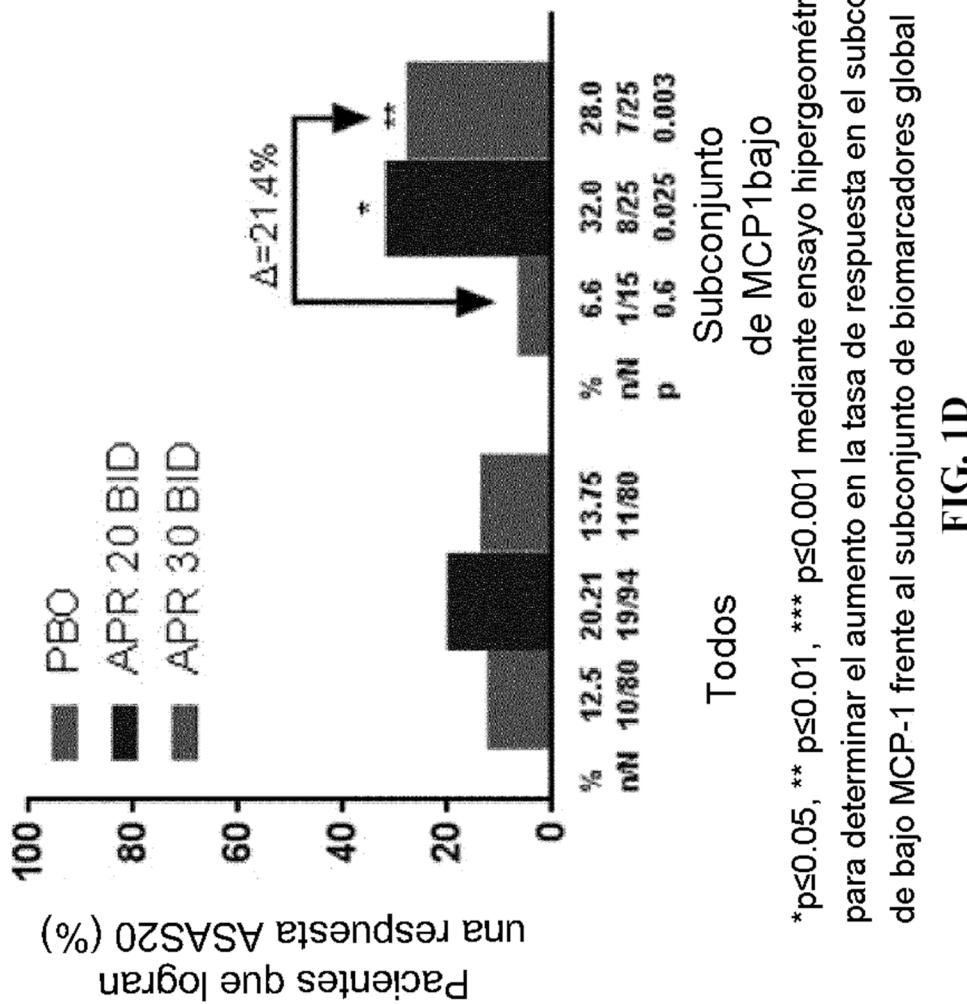
ASAS20 (Semana 16)



* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ mediante ensayo hipergeométrico para determinar el aumento en la tasa de respuesta en el subconjunto de bajo MCP-1 frente al subconjunto de biomarcadores global

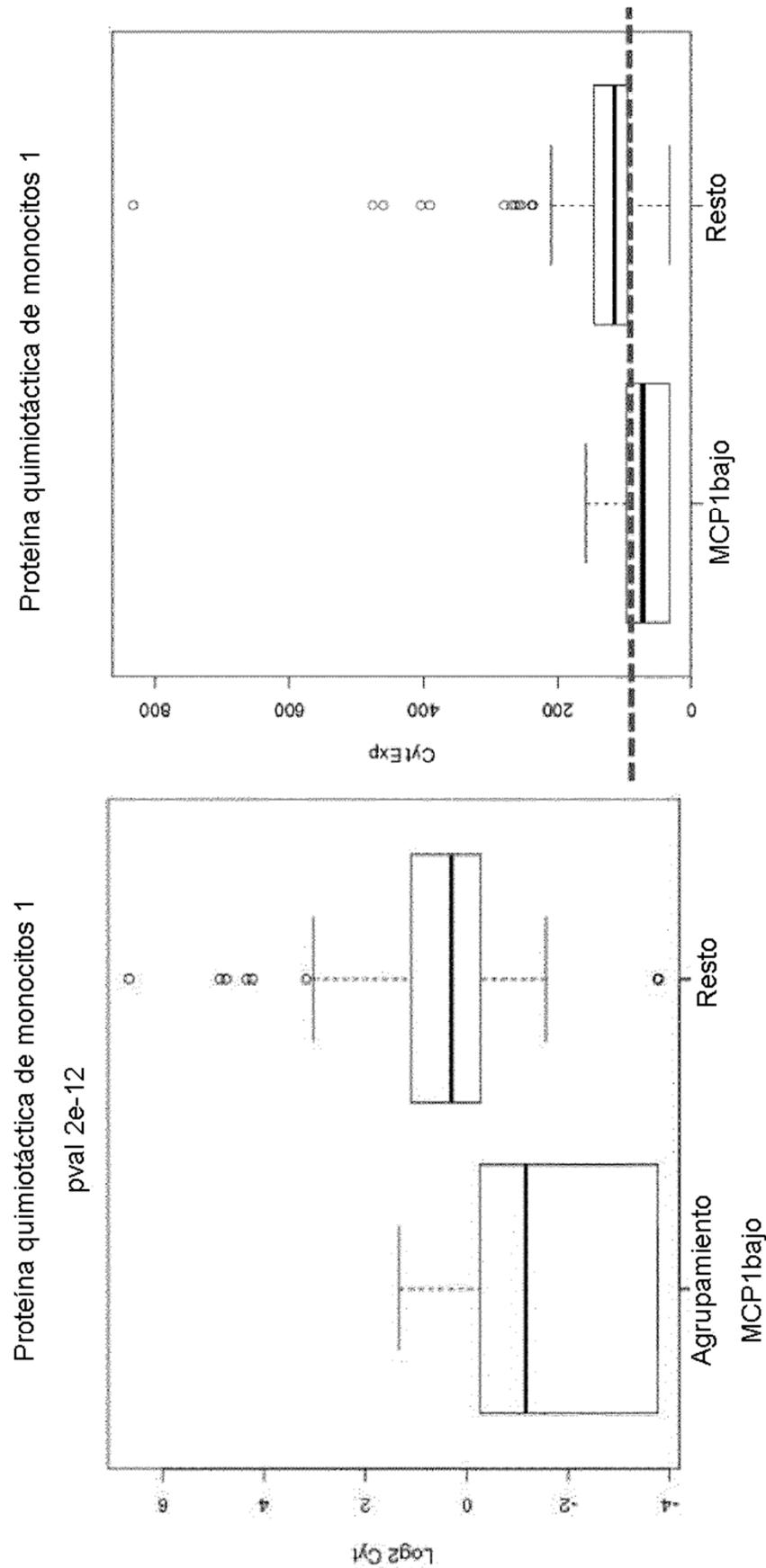
FIG. 1C

ASAS20 (Semana 16)



$*p \leq 0.05$, $** p \leq 0.01$, $*** p \leq 0.001$ mediante ensayo hipergeométrico para determinar el aumento en la tasa de respuesta en el subconjunto de bajo MCP-1 frente al subconjunto de biomarcadores global

FIG. 1D

**FIG. 2A**

Pertenencia a MCP1 bajo
Brazos de apremilast

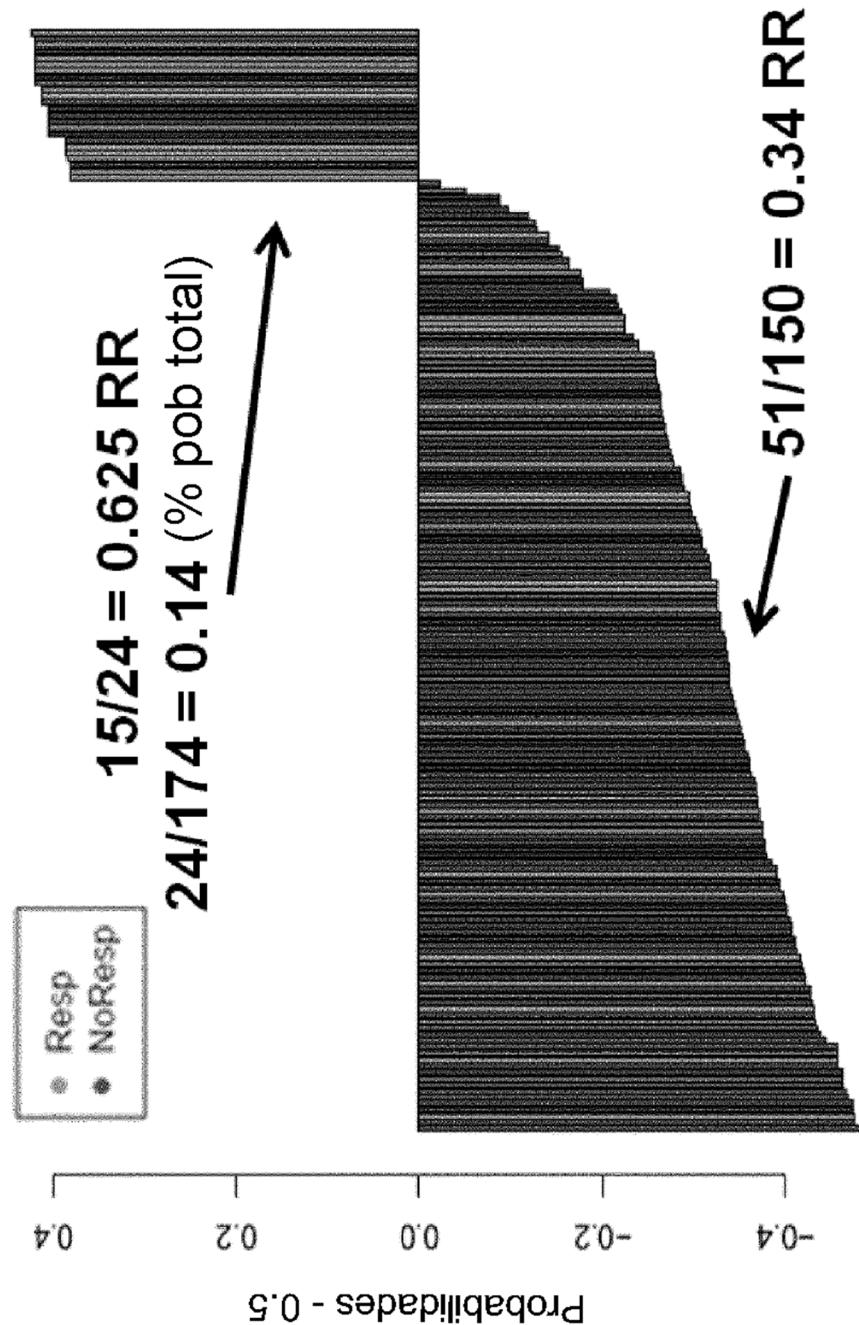


FIG. 2B

Pertenencia a MCP1bajo
Apremilast 30 mg

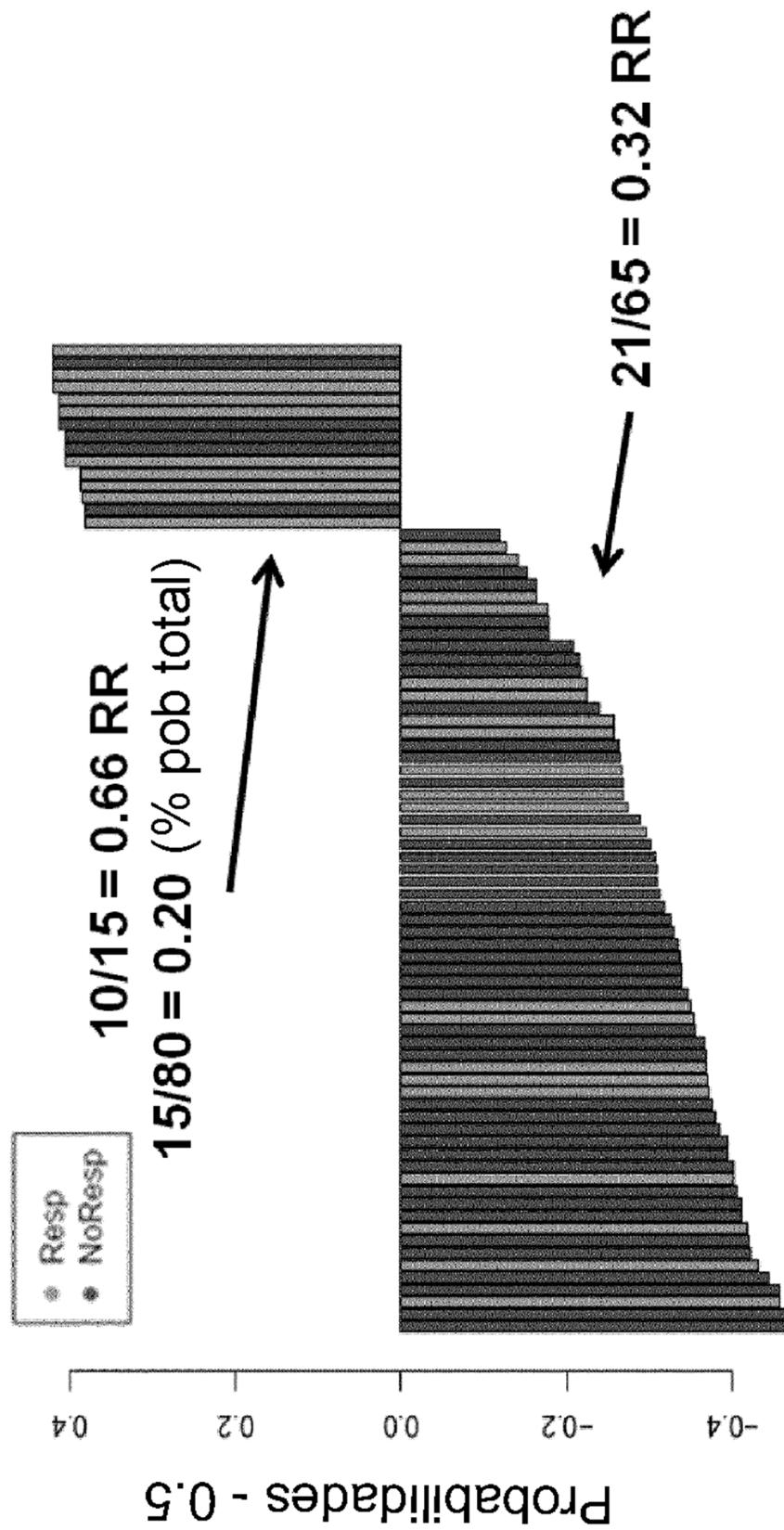


FIG. 2C

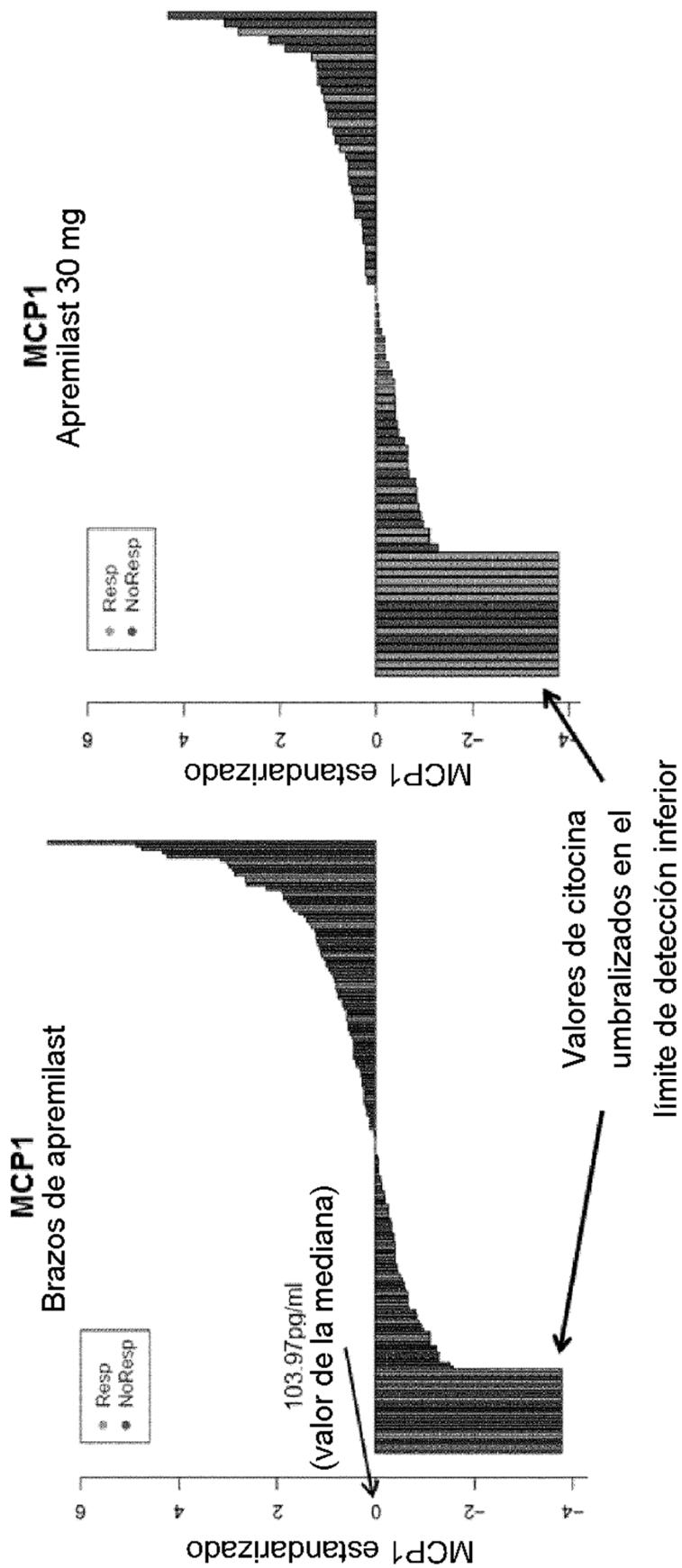


FIG. 2D

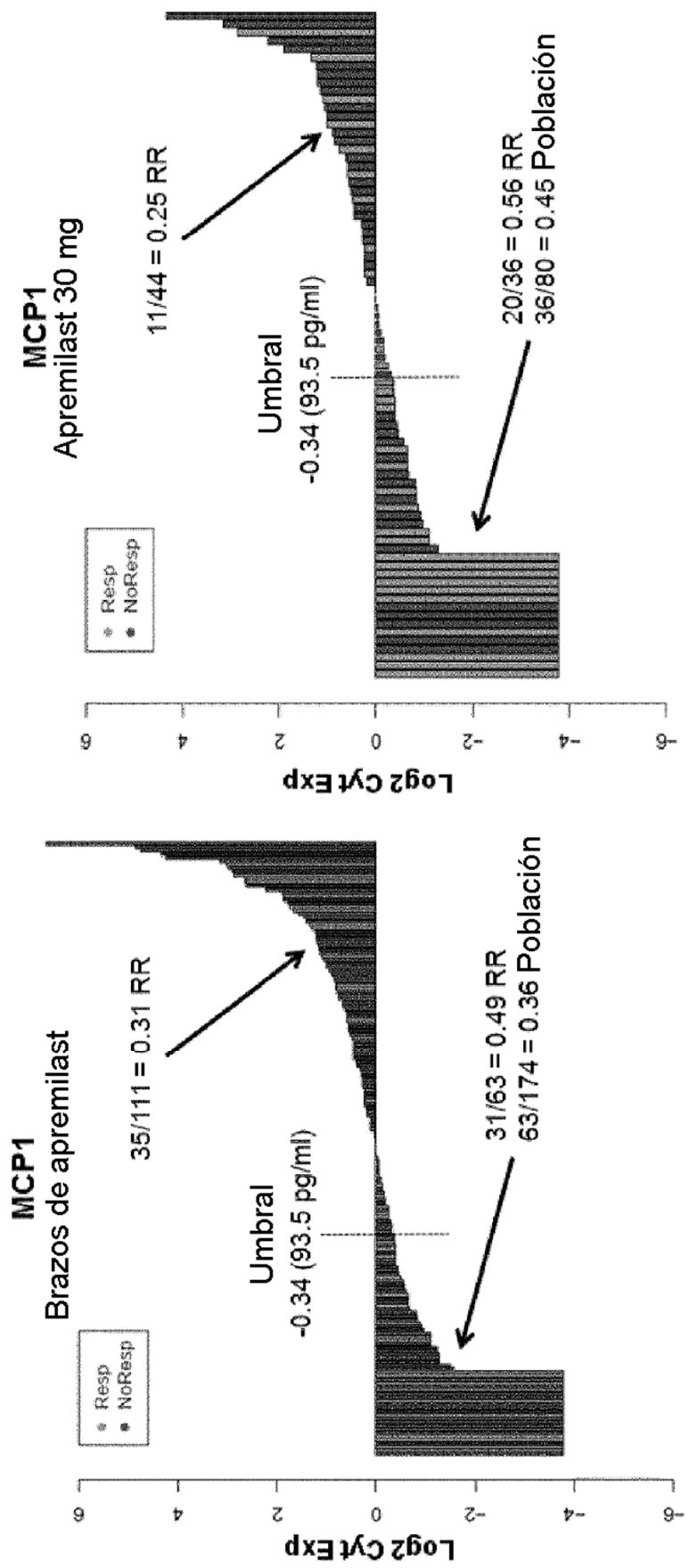


FIG. 2E

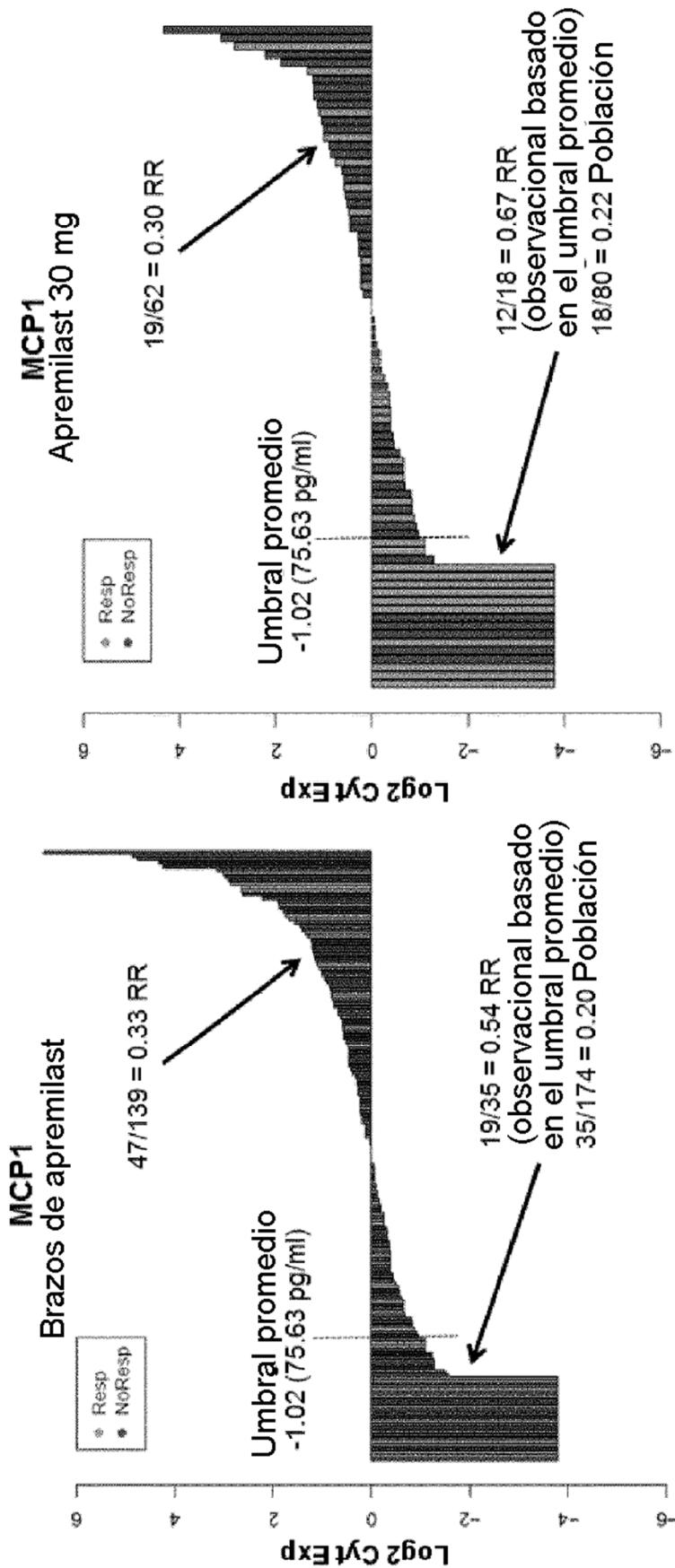


FIG. 2F

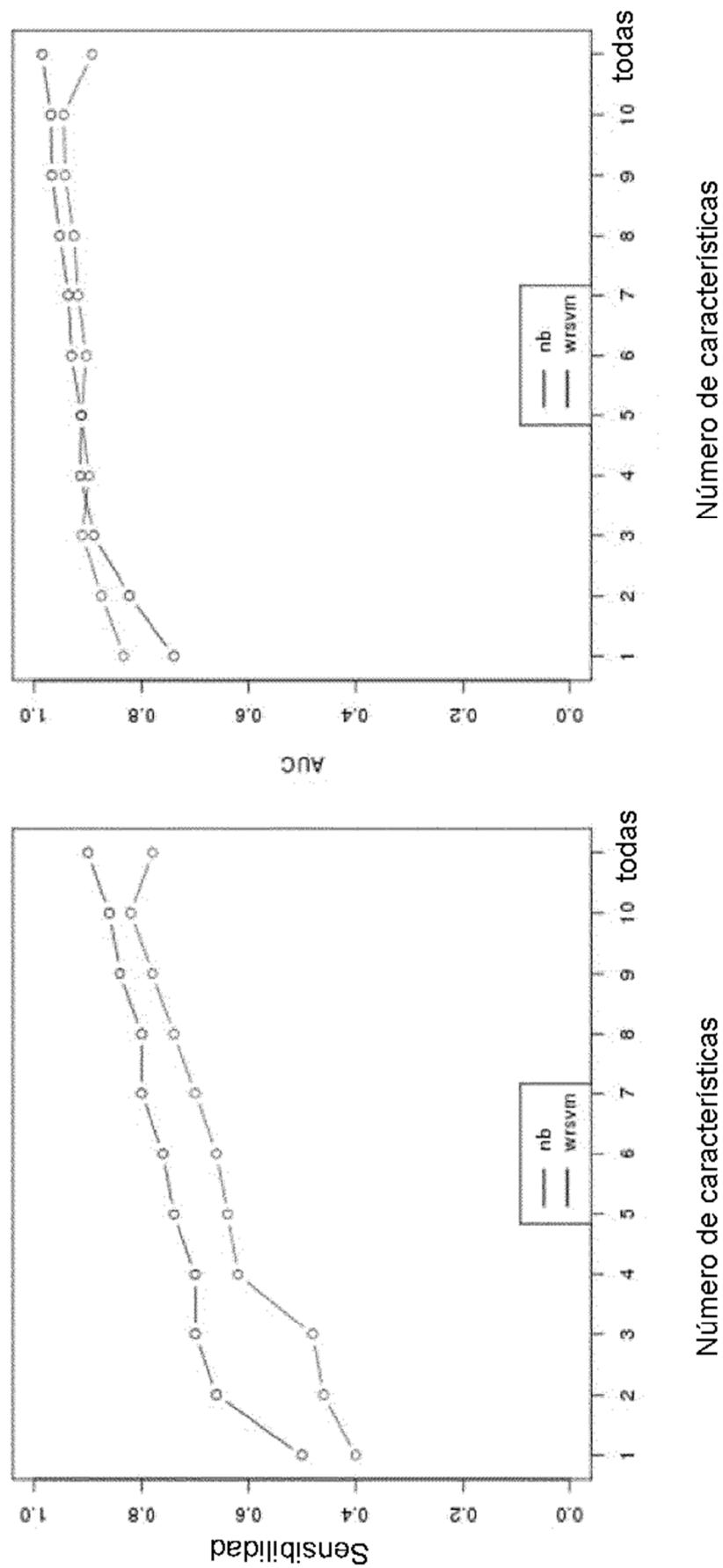


FIG. 3A

Número de características

Número de características

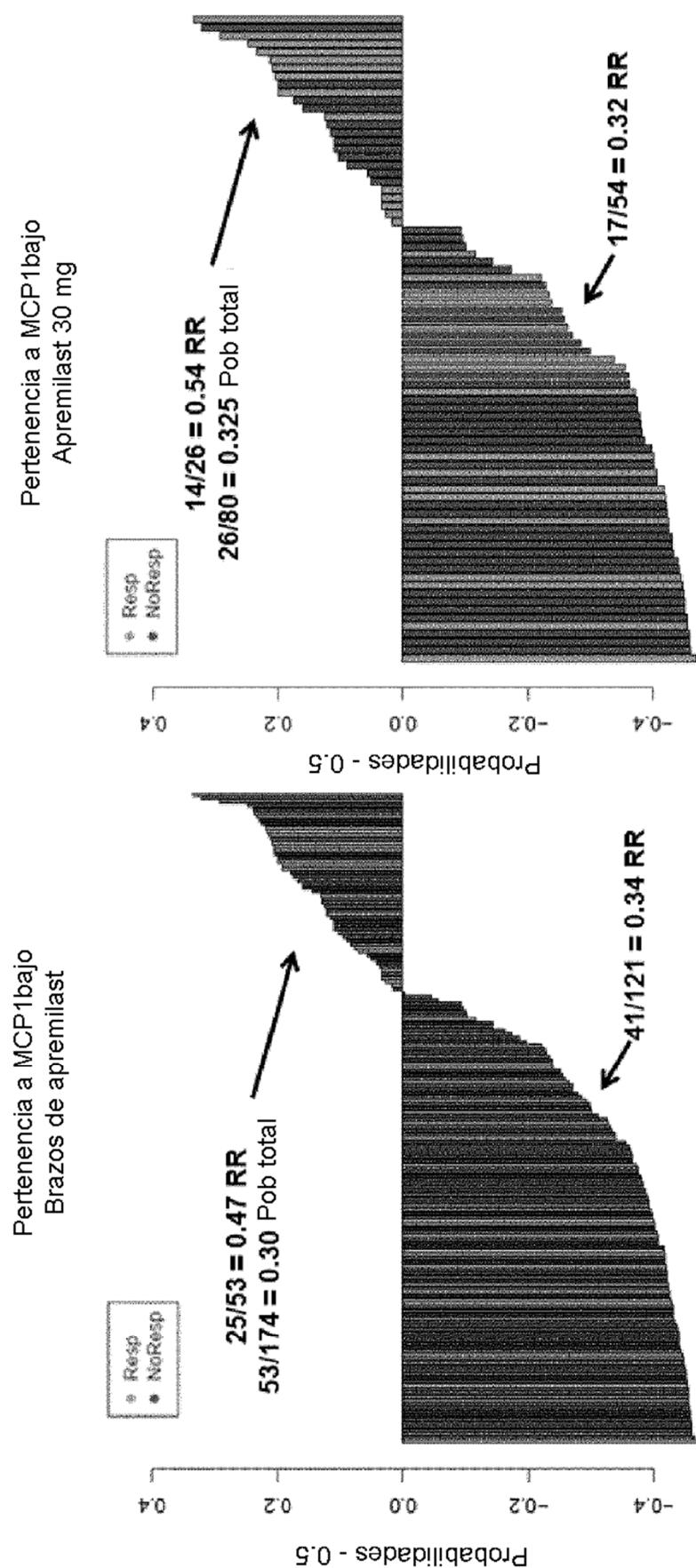


FIG. 3B

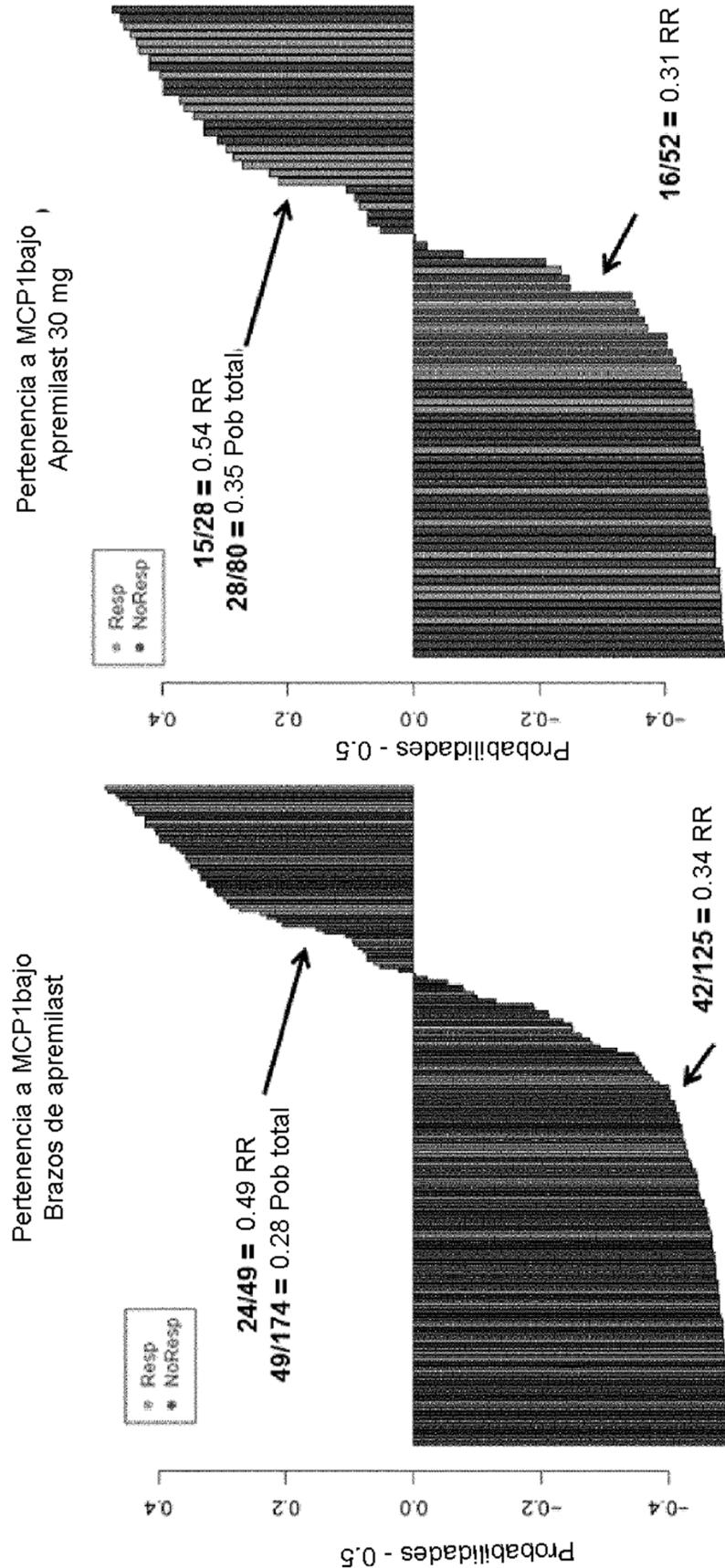


FIG. 3C

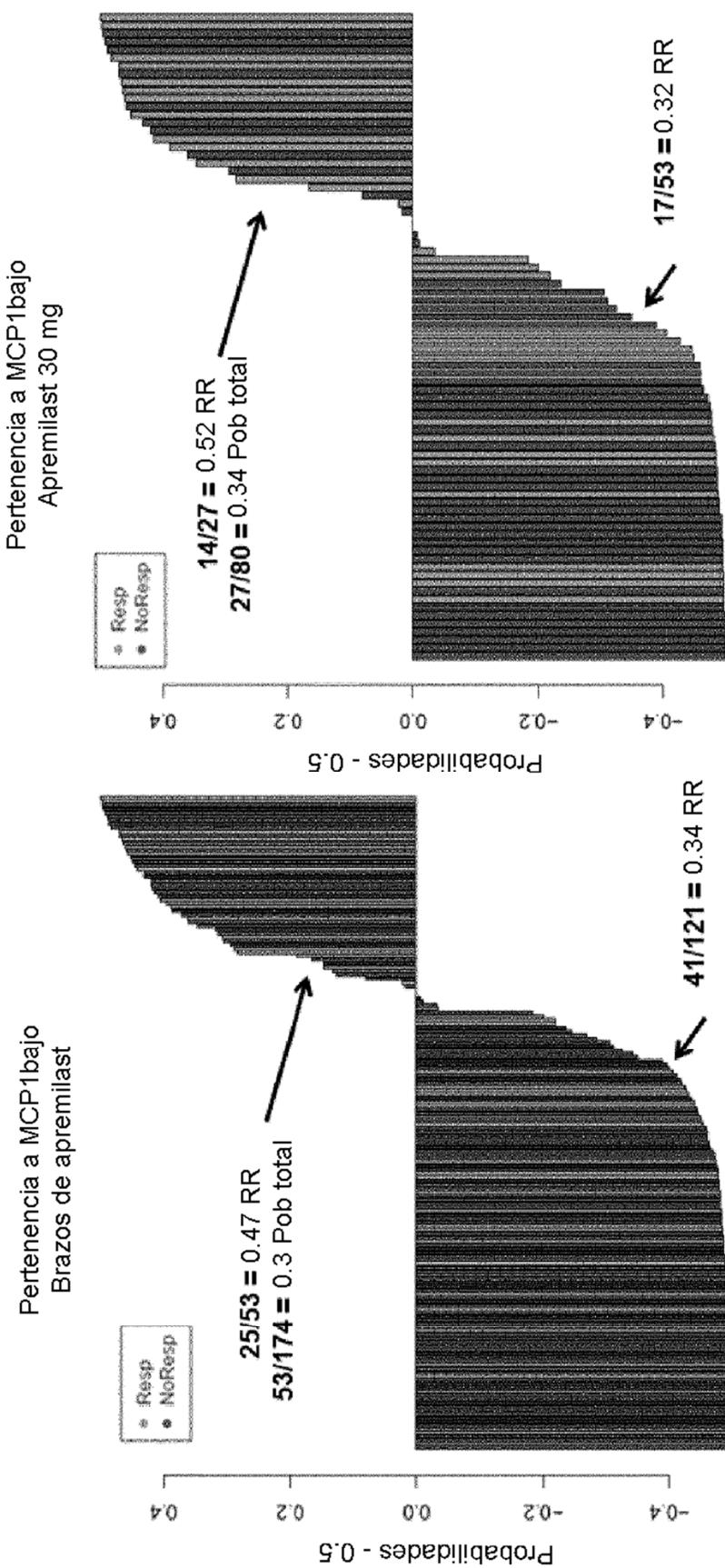


FIG. 3D

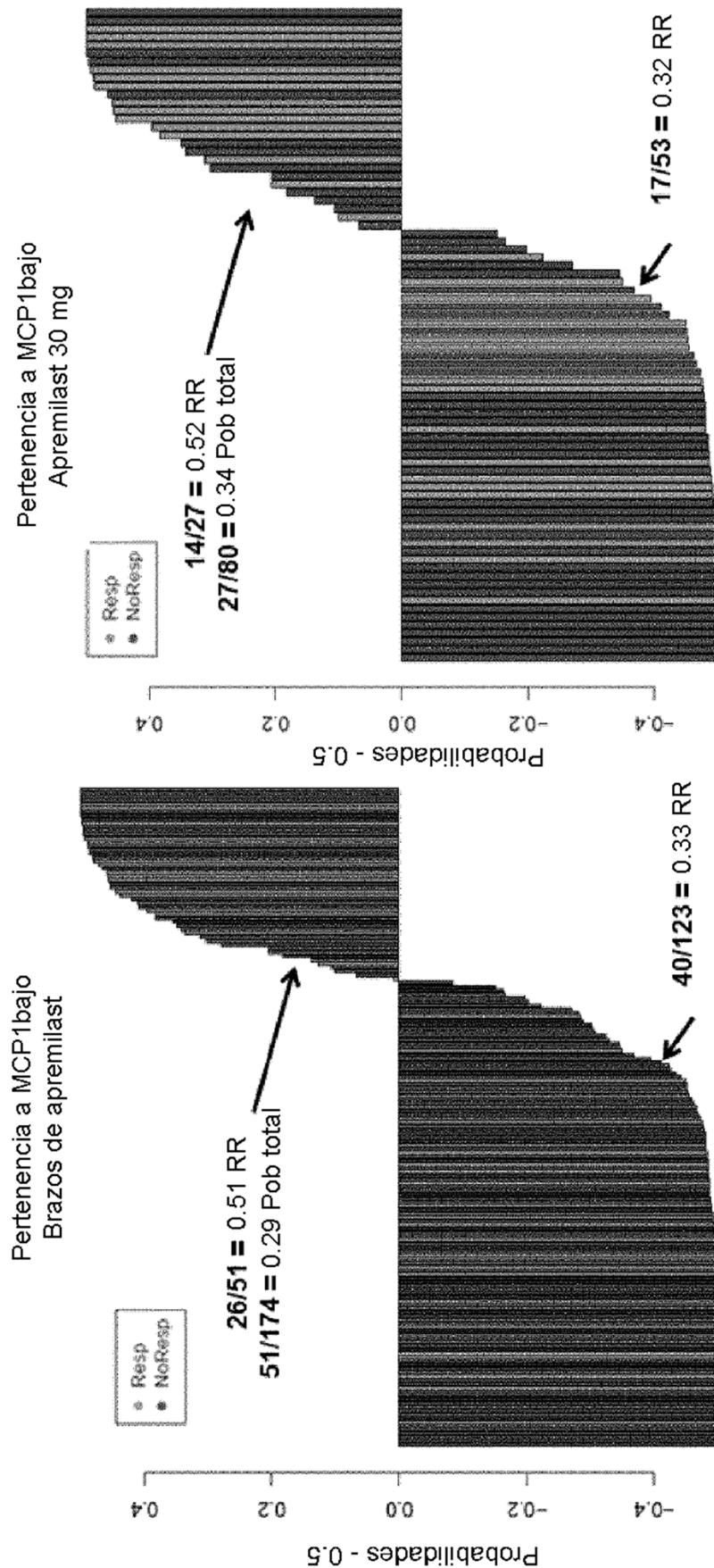


FIG. 3E