

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 587**

21 Número de solicitud: 201600636

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

26.07.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.02.2018

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2017/000089

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN  
MARQUÉS DE VALDECILLA (30.0%)  
Avda. Cardenal Herrera Oria s/n  
39011 Santander (Cantabria) ES;  
SERVICIO CÁNTABRO DE SALUD (30.0%);  
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA (5.0%);  
FIBHULP (5.0%) y  
VHIR (30.0%)**

72 Inventor/es:

**FERNANDEZ LUNA, José Luis;  
MARTINEZ TABOADA, Victor Manuel;  
LOPEZ HOYOS, Marcos;  
TORICES DEL VAL, Silvia;  
MUÑOZ CACHO, Pedro;  
VARELA EGOICHEAGA, Ignacio;  
BALSA CRIADO, Alejandro;  
MARSAL BARRIL, Sara y  
JULIA CANO, Antonio**

74 Agente/Representante:

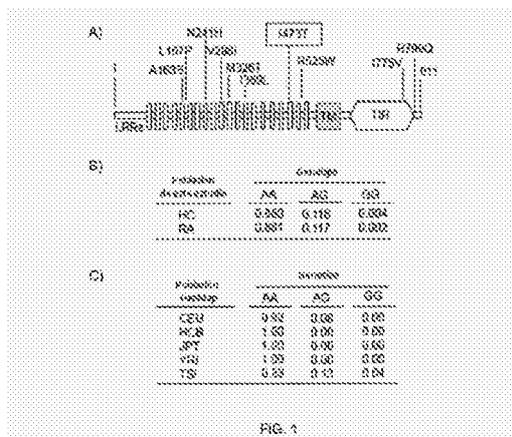
**PERALTA FERNÁNDEZ, Francisco Galo**

54 Título: **Método para predecir la respuesta clínica a un tratamiento con agentes antiinflamatorios**

57 Resumen:

Método para predecir la respuesta clínica a un tratamiento con agentes antiinflamatorios.

La presente invención se refiere al uso de variantes alélicas de TLR10 humano, incluyendo a la variante alélica de TLR10 humano I473T, como biomarcador para predecir la gravedad o el pronóstico en enfermedades inflamatorias, incluyendo la artritis reumatoide y/o para predecir la respuesta a un tratamiento con agentes antiinflamatorios, tales como agentes anti-TNF{al}.



ES 2 656 587 A1

**DESCRIPCIÓN****MÉTODO PARA PREDECIR LA RESPUESTA CLÍNICA A UN TRATAMIENTO CON AGENTES ANTIINFLAMATORIOS****CAMPO DE LA INVENCION**

5

La presente invención puede incluirse en el campo de la medicina personalizada. Más específicamente, la presente invención se refiere al uso de variantes alélicas de TLR10 humano, incluyendo a la variante alélica de TLR10 humano I473T, como biomarcador para predecir la gravedad o el pronóstico en enfermedades inflamatorias, incluyendo la artritis reumatoide y/o para predecir la respuesta a un tratamiento con agentes antiinflamatorios, tales como agentes anti-TNF $\alpha$ .

10

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmunitaria sistémica principalmente caracterizada por inflamación crónica del revestimiento sinovial y activación de Th1, lo que conduce a la destrucción progresiva de las articulaciones. Se ha sugerido que virus y bacterias pueden contribuir a iniciar o agravar la AR al unirse a receptores de tipo Toll (TLR) [Iwahashi M, *et al.*, *Arthritis Rheum* 2004, 50(5):1457-1467.; Pierer M, *et al.*, *J Immunol* 2004, 172(2):1256-1265].

20

Los TLR pertenecen a una familia de proteínas transmembrana que constituyen uno de los mecanismos de defensa primaria en enfermedades infecciosas y algunas no infecciosas en mamíferos [Gdor I, *et al.*, *Chem Phys* 2011, 13(9):3782-3787]. En particular, los TLR son glicoproteínas transmembrana de tipo I con repeticiones ricas en leucina (LRR) extracelulares y un dominio de homología con el receptor Toll/de IL-1 intracelular (TIR) [Ulevitch RJ, *Nat Rev Immunol* 2004, 4(7):512-520]. La activación inapropiada de rutas mediadas por TLR se ha implicado en la pérdida de autotolerancia que conduce a autoinmunidad e inflamación crónica [Wagner H, *Adv Immunol* 2006, 91:159-173; Deighton K, *et al.*, *Appetite* 2014, 81:52-59]. Además, se ha sugerido que los TLR están implicados en respuestas a patógenos en AR [Cromartie WJ, *et al.*, *J Exp Med* 1977, 146(6):1585-1602].

25

30

La señalización por los TLR implica interacción con adaptadores que contienen dominio TIR, incluyendo MyD88, TRIF, TRAM, TIRAP y SARM1 [O'Neill LA, Bowie AG; *Nat Rev Immunol* 2007, 7(5):353-364] que promueve la activación del factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B activadas (NF $\kappa$ B) entre otras funciones. La activación

35

dependiente de TLR de NF $\kappa$ B conduce a la producción de quimiocinas, citocinas y moléculas de adhesión celular proinflamatorias [O'Neill LA, Bowie AG; *Nat Rev Immunol* 2007, 7(5):353-364.; Drexler SK, et al., *Int J Biochem Cell Biol* 2010, 42(4):506-518]. Cada vez existen más pruebas de que NF $\kappa$ B es un factor de transcripción importante, si no el principal, que controla la inflamación [Abu-Soud HM, et al., *Biochemistry* 1998, 37(11):3777-3786] y descifrar los mecanismos que regulan la actividad de NF $\kappa$ B se considera de gran importancia para entender la respuesta a estímulos inflamatorios.

TLR10 sigue siendo el único miembro huérfano entre los TLR humanos porque sus ligandos siguen siendo desconocidos y existen datos discordantes acerca de su función [Oosting M, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, 111(42):E4478-4484.; Hasan U, et al., *J Immunol* 2005, 174(5):2942-2950]. La expresión de TLR10 se ha descrito principalmente en células B, células dendríticas, eosinófilos, neutrófilos y células no inmunitarias tales como trofoblastos [Hasan U et al., *J Immunol* 2005, 174(5):2942-2950.; Hornung V et al., *J Immunol* 2002, 168(9):4531-4537.; Nagase H, et al., *J Immunol* 2003, 171(8):3977-3982.; Mulla MJ, et al., *Am J Reprod Immunol* 2013, 69(5):449-453]. En mamíferos, TLR10, TLR1, y TLR6 comparten un locus común en el cromosoma 4p14 y son estructuralmente similares entre sí [Hasan U, et al., *J Immunol* 2005, 174(5):2942-2950]. Pese a interactuar con MyD88 [Hasan U, et al., *J Immunol* 2005, 174(5):2942-2950], TLR10 difiere de otros TLR por la falta de una ruta de señalización posterior clásica [Guan Y, et al., *J Immunol* 2010, 184(9):5094-5103]. La filogenia apoya la idea de que TLR10 surgió antes de la duplicación génica que generó TLR1 y TLR6 [Abhishek A, et al., *J Clin Rheumatol* 2010, 16(1):15-18.; Zhou H, et al., *J Mol Evol* 2007, 65(2):119-123]. TLR1 y TLR6 pueden formar un complejo proteico con TLR2 y TLR10 [Hasan U, et al., *J Immunol* 2005, 174(5):2942-2950.; Mulla MJ et al., *Am J Reprod Immunol* 2013, 69(5):449-453], aunque la contribución individual de cada proteína a la función del complejo se desconoce en gran medida.

Hoy en día, TLR10 es el único miembro de la familia de TLR sin una función biológica bien definida. Diversos estudios describen que TLR10 actúa como receptor proinflamatorio activando la señalización de NF $\kappa$ B [Hasan U, et al., *J Immunol* 2005, 174(5):2942-2950; Regan T, et al., *J Immunol* 2013, 191(12):6084-6092]. Otro estudio mostró que TLR10 no activa la señalización inducida por TLR típica, incluyendo activación transcripcional mediada por NF $\kappa$ B o interferón-beta (IFN $\beta$ ) [Guan Y, et al., *J Immunol* 2010, 184(9):5094-5103]. Recientemente, se ha mostrado que TLR10 es un modulador con efectos principalmente inhibidores [Stappers MH, et al., *J Infect Dis* 2015]. En línea con esto, bloquear TLR10 con

anticuerpos antagonistas potencia la producción de citocina proinflamatoria [Costing M, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, 111(42):E4478-4484]. Además, se han proporcionado pruebas de que TLR10 induce apoptosis a través de la activación de caspasa-3 [Kuuliala K, *et al.*, *Ann Rheum Dis* 2006, 65(9):1241-1243].

5

Variantes genéticas en miembros de la familia de TLR se han asociado principalmente con propensión a enfermedad en pacientes con AR con nivel de significación variable e incluso resultados discordantes [Kuuliala K, *et al.*, *Ann Rheum Dis* 2006, 65(9):1241-1243.; Radstake TR, *et al.*, *Arthritis Rheum* 2004, 50(3):999- 1001.; Etem EO, *et al.*, *Rheumatol Int* 2011, 31(10):1369-1374.; Coenen MJ, *et al.*, *PLoS One* 2010, 5(12):e14326; Zheng B, *et al.*, *Rheumatol Int* 2010, 30(9):1249-1252].

10

Un estudio previo investigó la asociación entre variantes de TLR10 y propensión a AR pero no se encontró significación estadística [Etem EO, *et al.*, *Rheumatol Int* 2011, 31(10):1369-1374]. Aunque variantes de un solo nucleótido del gen de TLR10 se han asociado con otras enfermedades autoinmunitarias [Requena T, *et al.*, *Immunogenetics* 2013, 65(5):345-355], tumores [Kutikhin AG, *Hum Immunol* 2011, 72(11):1095-1116], enfermedades infecciosas e inflamatorias tales como tuberculosis extrapulmonar y asma [Ma X, *et al.*, *PLoS One* 2007, 2(12):e1318; Lazarus R, *et al.*, *Am J Respir Crit Care Med* 2004, 170(6):594-600], la actividad funcional de esta proteína y la significación clínica de las variantes génicas son aún controvertidas [Hasan U, *et al.*, *J Immunol* 2005, 174(5):2942-2950.; Stappers MH, *et al.*, *J Infect Dis* 2015].

15

20

La variante alélica I473T solo se ha descrito en un trabajo previo asociado con un riesgo de meningioma disminuido [Rajaraman P, *et al.*, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010, 19(5):1356-1361].

25

Pese a haberse realizado avances significativos en los últimos años en el descubrimiento de marcadores pronósticos y/o predictivos relacionados con AR y enfermedades inflamatorias, existe una necesidad continuada de métodos mejorados para evaluar la gravedad y el pronóstico de la enfermedad, para predecir la evolución de la enfermedad y el riesgo de recurrencia o recaída, para permitir la clasificación de la población de pacientes según el pronóstico y seleccionar el tratamiento más apropiado en consecuencia. También se desea identificar regiones polimórficas dentro de un gen, tal como TLR10 humano, que se asocian con la respuesta a uno o más fármacos usados en el tratamiento de AR y otras

30

35

enfermedades inflamatorias, tales como fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARDs en inglés) o terapias biológicas, incluyendo inhibidores de TNF $\alpha$ .

## RESUMEN DE LA INVENCION

5

NF $\kappa$ B es un factor de transcripción implicado en muchos trastornos inflamatorios crónicos, incluyendo AR. Por primera vez, los autores de la invención han descrito que TLR10 puede inhibir la señalización de NF $\kappa$ B en células hematopoyéticas. Estudios funcionales *in vitro* mostraron que TLR10 reducía la activación de la ruta inflamatoria de NF $\kappa$ B en células hematopoyéticas, mientras que la variante I473T no tenía esta capacidad inhibidora. Los inventores observaron que, tras la estimulación de la ruta de NF $\kappa$ B con TNF $\alpha$  tras la exposición a infliximab (un inhibidor de TNF $\alpha$ ) las células que expresan la variante I473T mostraron una actividad de NF $\kappa$ B más alta en comparación con células que portan TLR10 de tipo natural.

15

Es conocido que los inhibidores de TNF $\alpha$  ayudan a controlar la evolución de la AR. Sin embargo, no todos los pacientes responden de manera adecuada al tratamiento anti-TNF $\alpha$  inicial [Alten R, *et al.*, *Int J Rheum Dis* 2014, 17(1):5-18]. Los inventores analizaron la asociación de la variante contrasentido de TLR10 humano, I473T, que se sitúa en el dominio LRR18, con AR observándose que la variante I473T no está asociada con propensión a AR. Sin embargo, se encontró que dicha variante correlaciona significativamente con enfermedad erosiva en pacientes seropositivos para anticuerpos frente a proteínas citrulinadas (ACPA) ( $p=0,017$  en la cohorte total y  $p=0,0049$  en mujeres) y con una respuesta inferior al tratamiento con infliximab medida mediante el índice DAS28 ( $p=0,012$ ) y mediante los criterios de la EULAR ( $p=0,049$ ), tal como se muestra en la figura 2B.

25

Los datos muestran que una variante genética de TLR10 selecciona un grupo de pacientes con una enfermedad más grave y resistente. Asimismo, dicha variante genética de TLR10 puede ser un buen marcador candidato de respuesta a infliximab u otros tratamientos anti-TNF $\alpha$  en pacientes con enfermedad inflamatoria y en particular con AR.

30

En un primer aspecto, la presente invención hace referencia a un método *in vitro* para predecir la respuesta clínica de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria a un agente anti-TNF $\alpha$ , en el que dicho método comprende:

35

- a) determinar, en una muestra biológica aislada de dicho sujeto, la presencia de uno o más polimorfismos de TLR10 que den lugar a una variante de TLR10 que ha perdido la capacidad de inhibir a NF $\kappa$ B.

**5** En una realización preferida, la presente invención hace referencia a un método *in vitro* para predecir la respuesta clínica de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria a un agente anti-TNF $\alpha$ , en el que dicho método comprende:

- a) determinar, en una muestra biológica aislada de dicho sujeto, el genotipo del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) rs11466657.

**10**

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para identificar un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria con un mayor riesgo de no responder al tratamiento con un agente anti-TNF $\alpha$ , en el que dicho método comprende la etapa a) según el primer aspecto.

**15**

En un aspecto relacionado, la invención hace referencia a un método *in vitro* para seleccionar un tratamiento para un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria, en el que dicho método comprende la etapa a) definida más arriba; y además comprende:

**20**

- b) seleccionar un agente anti-TNF $\alpha$  cuando el alelo (A) está presente en al menos uno de los alelos en el locus del SNP rs11466657, preferiblemente cuando el alelo (A) está presente en ambos alelos.

**25**

En un aspecto adicional, la invención hace referencia a un método *in vitro* para determinar la gravedad y/o el pronóstico de la enfermedad en un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria, comprendiendo dicho método la etapa a) definida anteriormente.

**30** Asimismo, hace referencia a un método *in vitro* para obtener datos útiles para determinar la respuesta clínica de un sujeto, que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria, a un agente anti-TNF $\alpha$ , la gravedad y/o el pronóstico de dicha enfermedad donde dicho método comprende la etapa a) definida anteriormente.

Asimismo, la invención proporciona un método para tratar un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria, en el que dicho método comprende la etapa a) definida anteriormente; y además comprende:

- 5                    b) administrar a dicho sujeto un agente anti-TNF $\alpha$  cuando el alelo (A) está presente en al menos uno de los alelos en el locus del SNP rs11466657, preferiblemente cuando el alelo (A) está presente en ambos alelos.

Además, la presente invención hace referencia a un agente anti-TNF $\alpha$  para su uso en un  
10 sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria, en el que dicho sujeto presenta el alelo (A) en al menos uno de los alelos en el locus del SNP rs11466657, preferiblemente en el que dicho sujeto es homocigoto para el alelo (A).

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un kit para determinar en una muestra  
15 biológica aislada de un sujeto el genotipo de uno o más polimorfismos de TLR10 que den lugar a una variante de TLR10 que ha perdido la capacidad de inhibir a NF $\kappa$ B, donde dicho kit comprende:

- un reactivo para determinar el genotipo de dichos polimorfismos;
- opcionalmente, instrucciones para el uso de dicho reactivo en la determinación del  
20 genotipo de dichos polimorfismos en una muestra biológica aislada.

La invención se refiere también al uso de un kit, tal y como se ha descrito en el aspecto anterior, para predecir la respuesta clínica de un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria, para identificar un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria con riesgo de  
25 no responder a un tratamiento con un agente anti-TNF $\alpha$ , para seleccionar un tratamiento para un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria, o para determinar la gravedad y/o el pronóstico de una enfermedad inflamatoria en un sujeto, de acuerdo con los métodos de la invención.

30  
**BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**Figura 1.** Variantes del gen de TLR10. (A) Representación esquemática de la proteína TLR10 que ilustra la posición de las variantes contrasentido (“missense” en inglés)  
35 identificadas mediante secuenciación de nueva generación (NGS). LRR, repeticiones ricas

en leucina; TM, dominio transmembrana; TIR, dominio de receptor Toll-de interleucina. (B) Distribución de genotipo de la variante I473T en la cohorte independiente de 1493 controles sanos (HC) y 1201 pacientes con artritis reumatoide (RA). (C) Frecuencias de genotipo de TLR10 en poblaciones HapMap (HapMap es un mapa de haplotipos en el genoma humano; International HapMap consortium et al. (2010), Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations, Nature, 467, 52-8).

**Figura 2.** Asociación de la variante I473T con la gravedad de la enfermedad en dos cohortes de (A) 453 y (B) 1201 pacientes con AR. Se estimó el valor de beta (coeficiente de regresión), usado para evaluar el efecto de la variante I473T (riesgo genético), para varios hallazgos clínicos. Un coeficiente de regresión positivo significa que la variante aumenta el riesgo. Las líneas discontinuas indican los valores de punto de corte. Los parámetros clínicos se categorizaron como variables binarias. Eccp/años, asociación con erosiones en pacientes positivos para ACPA incluyendo los años de evolución de la enfermedad; Eccp/años en mujeres, asociación con erosiones en pacientes femeninos positivos para ACPA incluyendo los años de evolución de la enfermedad; IFX-EULAR, asociación con la respuesta a infliximab (criterios de respuesta de la EULAR: moderada/buena frente a ninguna); IFX-DAS28, asociación con cambio en DAS28 en pacientes tratados con infliximab.

**Figura 3.** Regulación de la actividad transcripcional de NF $\kappa$ B por la variante I473T. (A) estructura 3D de TLR10 usando el visor Jmol que muestra la ubicación del residuo I473. NAG, 2-(acetilamino)-2-desoxi-beta-D-glucopiranososa. (B) y (C) Se cotransfectaron células K562 y U937 (respectivamente) con TLR10 de tipo natural (wild type o wt) o su variante mutada (mut) y un vector indicador que contiene secuencias que responden a NF $\kappa$ B. Se estimularon las células con TNF $\alpha$  10 ng/ml durante 24 h y después se prepararon y se analizaron los extractos celulares para determinar la actividad luciferasa. Asimismo, se trataron con TNF $\alpha$  células (D) K562 y (E) U937 transfectadas con las variantes de TLR10 indicadas en presencia o en ausencia de infliximab y se analizó la actividad luciferasa. Los histogramas muestran la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \*p<0,05.

**Figura 4.** Regulación de los niveles de genes diana de NF $\kappa$ B por la variante I473T. Se transfectaron células U937 (A, B, C) y K562 (D, E, F) con TLR10 (de tipo natural o variante mutada) y entonces se trataron o no con TNF $\alpha$  20 ng/ml en presencia o en ausencia de infliximab (IFX) durante 24 h. Se determinó la expresión de genes diana de NF $\kappa$ B, CCL2 (A,

D, F) TRAIL (B, E) y TNF $\alpha$  (C) mediante RT-PCR cuantitativa. Se usó  $\beta$ -actina para normalización. C, células transfectadas con vector vacío como control adicional. Los histogramas muestran la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \*p<0,05.

## 5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### Definiciones

El término "sujeto" tal como se usa en el presente documento se refiere a un sujeto mamífero. Preferiblemente, se selecciona de un humano, animal de compañía, ganado no doméstico o animal de zoo. Por ejemplo, el sujeto puede seleccionarse de un humano, perro, gato, vaca, cerdo, oveja, caballo, oso, etc. En una realización preferida, dicho sujeto mamífero es un sujeto humano.

El término "sujeto que tiene una enfermedad" tal como se usa en el presente documento se refiere a aquellos sujetos a los que se les ha diagnosticado dicha enfermedad. Por ejemplo, un "diagnóstico confirmado de artritis reumatoide" o "artritis reumatoide definitiva" puede basarse en la presencia confirmada de sinovitis en al menos una articulación, ausencia de un diagnóstico alternativo que explique mejor la sinovitis, y el logro de una puntuación total de 6 o mayor (de un máximo posible de 10) a partir de las puntuaciones individuales en cuatro dominios que incluyen: número y emplazamiento de articulaciones afectadas (rango 0-5), alteraciones serológicas (rango 0-3), respuesta de fase aguda elevada (rango 0-1) y duración de los síntomas ( dos niveles, rango 0-1). El significado de estos parámetros es tal y como se define en los criterios de clasificación EULAR (Ann Rheum Dis 2010; 69: 1580-1588).

El término "sujeto que se sospecha que tiene una enfermedad" tal como se usa en el presente documento se refiere a un sujeto que presenta uno o más signos o síntomas indicativos de dicha enfermedad. Un sujeto que se sospecha que tiene una enfermedad también puede tener uno o más factores de riesgo (es decir, un sujeto que se sospecha que va a desarrollar o que presenta riesgo de desarrollar una enfermedad). Además abarca a un individuo que ha recibido un diagnóstico preliminar pero para el cual no se ha realizado una prueba de confirmación. Además, incluye aquellos individuos en remisión.

El término "examen" tal como se usa en el presente documento se refiere a identificar, determinar o distinguir a aquellos sujetos o individuos que presentan las características o el

fenotipo definidos. Puede usarse una prueba de "examen" cuando se sospecha la presencia de dichas características o fenotipo.

5 El término "tratamiento" abarca tanto un tratamiento profiláctico como terapéutico. El término "tratamiento terapéutico" o "terapia" tal como se usa en el presente documento se refiere a llevar a un cuerpo de un estado patológico o de enfermedad de vuelta a su estado normal, sano. El término "tratamiento profiláctico" tal como se usa en el presente documento se refiere a prevenir un estado patológico.

10 El término "respuesta a un tratamiento" tal como se usa en el presente documento se refiere al grado en el que un tratamiento logra los resultados deseados o previstos, por ejemplo la capacidad de una terapia o un fármaco para conseguir el efecto clínico deseado.

15 El término "enfermedad inflamatoria" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier enfermedad en la que hay una respuesta inflamatoria excesiva o alterada que conduce a síntomas inflamatorios. Dichas enfermedades inflamatorias incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Addison, acné vulgaris, alopecia areata, amiloidosis, ulceraciones, estomatitis aftosa, arteriosclerosis, artritis, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, artritis psoriásica, espondiloartropatía, espondilitis anquilosante, asma bronquial, enfermedad de Behcet, enfermedad de Boeck, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, coroiditis, colitis ulcerosa, enfermedad de celíaca, crioglobulinemia, degeneración macular, dermatitis, dermatitis herpetiforme, dermatomiositis, diabetes dependiente de insulina, diabetes juvenil, enfermedad desmielinizante inflamatoria, contractura de Dupuytren, encefalomiелitis, encefalomiелitis alérgica, endoftalmitis, enteritis alérgica, síndrome de enteropatía autoinmune, eritema nudoso leproso, parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, fibrosis quística, gingivitis, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, síndrome de Graves, enfermedad de Hashimoto, hepatitis crónica, histiocitosis, ileitis regional, iritis, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso cutáneo, lupus eritematoso diseminado, linfogranuloma, mononucleosis infecciosa, miastenia gravis, mielitis transversa, mixedema idiopático primario, nefrosis, obesidad, oftalmía simpática, granulomatosa orquitis, pancreatitis, paniculitis, pénfigo vulgar, la periodontitis, la poliarteritis nodosa, poliartritis crónica, polimiositis, polirradiculitis aguda, psoriasis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la púrpura, pioderma gangrenoso, síndrome de Reiter, la retinopatía diabética, la rosácea, la sarcoidosis, esclerosis atáxica, esclerosis sistémica progresiva, escleritis, esclerodermia, esclerosis múltiple, esclerosis diseminada, uveítis, vitíligo, enfermedad de Whipple, enfermedades asociadas al SIDA,

30  
35

inmunodeficiencia combinada severa y al virus de Epstein Barr: tales como el síndrome de Sjogren, la tuberculosis osteoarticular y enfermedades parasitarias: como la leishmaniasis.

**5** El término "enfermedad reumática inflamatoria" tal como se usa en el presente documento se refiere a una enfermedad del aparato locomotor y/o de los tejidos conjuntivos en los que los mecanismos inflamatorios desempeñan un papel importante. Una enfermedad reumática puede afectar a articulaciones, huesos, cartilago, tendones, ligamentos y músculos.

**10** Una "muestra" en el contexto de la presente invención es una muestra biológica que contiene cualquier tipo de célula corporal y puede incluir, como ejemplos ilustrativos y no limitativos, fluidos corporales y/o extractos de tejido tales como homogeneizados o tejido solubilizado obtenidos de un sujeto. Los extractos de tejido se obtienen de manera rutinaria de una biopsia de tejido. Una muestra biológica útil en la presente invención incluye sangre, orina, saliva, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, lavado bronquial, líquido ascítico, **15** aspirado de médula ósea, derrame pleural, así como cualquier tejido, líquido o cualquier otro constituyente corporal que pueda contener células. En una realización preferida, la muestra que va a someterse a prueba es saliva o sangre. En una realización más preferida, la muestra es una muestra de sangre.

**20** El término "alelo" tiene el significado que se conoce comúnmente en la técnica, es decir, una forma alternativa de un gen (un miembro de un par) que se sitúa en una posición específica en un cromosoma específico que, cuando se traduce da como resultado productos génicos funcionales o disfuncionales (incluyendo no existentes).

**25** El término "polimorfismo" o "variante alélica" se refiere a una variación de secuencia común de un gen. Pueden encontrarse variantes alélicas en los exones, intrones, regiones reguladoras sin traducir del gen, o en las secuencias que controlan la expresión del gen. La secuenciación génica completa permite a menudo identificar numerosas variantes alélicas para un gen concreto. La significación de las variantes alélicas a menudo no está clara hasta **30** realizarse un estudio adicional del genotipo y el fenotipo correspondiente en una población suficientemente grande.

**35** El término "polimorfismo de un solo nucleótido" o "SNP" se refiere a un tipo de polimorfismo de ADN que implica la variación de un único par de bases. Existen millones de SNP en el genoma humano. Comúnmente, estas variaciones se encuentran en secuencias codificantes de genes, regiones no codificantes de genes o en regiones intergénicas entre genes. La

presencia de un SNP dentro de un gen o en una región reguladora cerca de un gen, pueden desempeñar un papel más directo en la enfermedad afectando a la función del gen.

5 El término "sonda" tal como se usa en el presente documento se refiere a ácidos nucleicos sintéticos o producidos biológicamente, de entre 10 y 285 pares de bases de longitud que contienen secuencias de nucleótidos específicas que permiten hibridación específica y preferente en condiciones predeterminadas para seleccionar como diana secuencias de ácido nucleico, y contienen opcionalmente un resto para detectar o para potenciar el rendimiento del ensayo. Generalmente es necesario un mínimo de diez nucleótidos con el fin de obtener de manera estadística especificidad y formar productos de hibridación estables, y un máximo de 285 nucleótidos generalmente representa un límite superior para la longitud en la que los parámetros de reacción pueden ajustarse fácilmente para determinar secuencias apareadas erróneamente a hibridación preferente. Las sondas pueden contener opcionalmente determinados constituyentes que contribuyen a su funcionamiento adecuado u óptimo en determinadas condiciones de ensayo. Por ejemplo, pueden modificarse las sondas para mejorar su resistencia a la degradación con nucleasa (por ejemplo, mediante ocupación de extremos), para portar ligandos de detección (por ejemplo, fluoresceína) o para facilitar su captura sobre un soporte sólido (por ejemplo, "colas" de poli-desoxiadenosina).

20 El término "cebadores" tal como se usa en el presente documento se refiere a oligonucleótidos que pueden usarse por ejemplo en un método de amplificación, tal como una reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"), para amplificar una secuencia de nucleótidos. Los cebadores se designan basándose en la secuencia de polinucleótidos de una secuencia diana particular. El diseño y la validación de cebadores y sondas se conocen bien en la técnica. Para métodos de PCR cuantitativos en tiempo real, véase por ejemplo Rodríguez A *et al.* (Methods Mol Biol., 2015, 1275:31-56).

30 El término "específico" tal como se usa en el presente documento en relación con una secuencia de nucleótidos significa que una secuencia de nucleótidos se hibridará con/amplificará una secuencia diana predeterminada y no se hibridará con/amplificará sustancialmente una secuencia no diana en las condiciones de ensayo, generalmente se usan condiciones rigurosas.

35 El término "hibridación" tal como se usa en el presente documento se refiere a un proceso mediante el cual, en condiciones de reacción predeterminadas, se permite que se junten dos

cadena de ácido nucleico parcial o completamente complementarias de un modo antiparalelo para formar un ácido nucleico bicatenario con puentes de hidrógeno específicos y estables, siguiendo normas explícitas correspondientes a qué bases de ácido nucleico pueden emparejarse entre sí.

5

El término "hibridación sustancial" significa que la cantidad de hibridación observada será tal que alguien que observe los resultados podría considerar el resultado positivo con respecto a los datos de hibridación en controles positivos y negativos. Los datos que se consideran "ruido de fondo" no son hibridación sustancial.

10

El término "condiciones de hibridación rigurosas" significa aproximadamente de 35°C a 65°C en una disolución de sal de NaCl aproximadamente 0,9 molar. También puede regirse la rigurosidad por parámetros de reacción tales como la concentración y el tipo de especies iónicas presentes en la disolución de hibridación, los tipos y las concentraciones de agentes desnaturizantes presentes, y la temperatura de hibridación. Generalmente a medida que se vuelven más estrictas las condiciones de hibridación, se prefieren sondas más largas si van a formarse híbridos estables. Como norma, la rigurosidad de las condiciones en las que se realiza la hibridación dictarán determinadas características de las sondas preferidas que van a emplearse.

20

El término "identidad" tal como se usa en el presente documento se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido con nucleótido o aminoácido con aminoácido de dos secuencias de polipéptido o polinucleótidos o, respectivamente. Pueden compararse dos o más secuencias (de polinucleótidos o aminoácidos) determinando su "porcentaje de identidad". El "porcentaje de identidad" de dos secuencias, ya sean secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos, es el número de coincidencias exactas entre dos secuencias alineadas dividido entre la longitud de la secuencia más corta y multiplicado por 100. Programas adecuados para calcular la identidad en porcentaje o similitud entre secuencias se conocen bien en la técnica, tal como el programa BLAST de NCBI, usado por ejemplo con los parámetros por defecto (<http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>).

30

El término "parcialmente idéntica/complementaria" tal como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia que es idéntica/complementaria en al menos aproximadamente el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% a una secuencia de referencia. En algunas realizaciones, la secuencia parcialmente idéntica/complementaria puede ser sustancialmente idéntica/complementaria a una

35

secuencia de referencia, que es idéntica/complementaria en al menos aproximadamente el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% a dicha secuencia de referencia. En una realización, la secuencia parcialmente idéntica/complementaria es idéntica/complementaria en el 100% a una secuencia de referencia.

5

El término "kit" indica un conjunto de reactivos y coadyuvantes requeridos para un análisis. Aunque un kit consiste en la mayoría de los casos de varias unidades, también pueden estar disponibles los varios elementos de análisis presentados en una única unidad, que deben considerarse como kits.

10

### Descripción

#### Un método para predecir la respuesta clínica a un agente anti-TNF $\alpha$

15 En un primer aspecto, la presente invención hace referencia a un método *in vitro* para predecir la respuesta clínica de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria a un agente anti-TNF $\alpha$ , en el que dicho método comprende:

20 a) determinar, en una muestra biológica aislada de dicho sujeto, la presencia de uno o más polimorfismos de TLR10 que den lugar a una variante de TLR10 que ha perdido la capacidad de inhibir a NF $\kappa$ B.

25 El NF- $\kappa$ B (*factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas*) juega un papel clave en la regulación de la respuesta inmune debida a la infección. La regulación defectuosa del NF- $\kappa$ B está también relacionada con el cáncer, enfermedades inflamatorias y autoinmunes, shock séptico, infecciones virales o un desarrollo inmune inadecuado. También está implicado en procesos de plasticidad sináptica y de memoria.

30 En una realización particular, dicha variante de TLR10 presenta al menos un polimorfismo que da lugar a una sustitución aminoacídica contrasentido. Dichos polimorfismos incluyen pero no se limitan a aquellos indicados en la tabla 2. Preferiblemente, dicho polimorfismo es seleccionado entre rs11466657 y rs11466650. Más preferiblemente, dicho polimorfismo es rs11466657.

Así pues, en una realización preferida, la presente invención hace referencia a un método *in vitro* para predecir la respuesta clínica de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria a un agente anti-TNF $\alpha$ , en el que dicho método comprende:

- 5 a) determinar, en una muestra biológica aislada de dicho sujeto, el genotipo del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) rs11466657.

Asimismo, se refiere a un método *in vitro* para identificar un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria con un mayor riesgo de no responder al tratamiento con un agente anti-TNF $\alpha$ , en el que dicho método comprende la etapa a) según el primer aspecto.

La invención hace referencia también a un método *in vitro* para obtener datos útiles para determinar la respuesta clínica de un sujeto, que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria, a un agente anti-TNF $\alpha$ , donde dicho método comprende la etapa a) descrita anteriormente.

El polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) rs11466657 ha sido previamente descrito y su secuencia está disponible en bases de datos públicas ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=11466657](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=11466657)). Tal y como muestra la figura 1A, rs11466657 se encuentra situado en la región que codifica para el dominio LRR18 de TLR10 humano.

El rs11466657 se encuentra en el cromosoma 4, en la posición 38774173 y corresponde por ejemplo a la posición 2056 del transcrito de TLR10 humano NM\_030956.3 (SEQ ID NO:1). Para dicha posición (locus) el alelo ancestral es T y se ha descrito un cambio alélico de ATT a ACT que se traduce en un cambio en la secuencia proteica (NP\_112218.2; SEQ ID NO:2) de isoleucina (Ile) a treonina (Thr) en la posición 473 (I473T). Cuando dicho polimorfismo se determina en la cadena complementaria el cambio alélico es de A a G (ver ejemplo 2). En la presente invención la variante alélica del SNP rs11466657, que da lugar al cambio de aminoácido I473T se refiere como alelo (G).

De acuerdo con los datos presentados en el ejemplo 2, los pacientes con la variante I473T muestran una respuesta significativamente menor a agentes anti-TNF $\alpha$ , de acuerdo con el índice DAS28 (Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL (1995). Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts.

Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 38, 44-48) y los criterios de respuesta EULAR (Karonitsch T, Aletaha D, Boers M, Bombardieri S, Combe B, Dougados M, Emery P, Felson D, Gomez-Reino J, Keystone E, Kvien TK, Martin-Mola E, Matucci-Cerinic M, Richards P, van Riel P, Siegel J, Smolen JS, Sokka T, van der Heijde D, van Vollenhoven R, Ward M, Wells G, Zink A, Landewe R. (2008). Methods of deriving EULAR/ACR recommendations on reporting disease activity in clinical trials of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 67(10), 1365-73), lo cual indica también que dicha variante selecciona a un grupo de pacientes con una enfermedad más grave o severa.

10

Así pues, la determinación de la presencia del alelo (G) en al menos uno de los alelos en el locus del SNP rs11466657, preferiblemente la determinación del alelo (G) en ambos alelos (i.e., genotipo GG) es indicativo de un mayor riesgo de no responder al agente antiinflamatorio. En otras palabras es predictivo de ausencia de respuesta clínica o resistencia al tratamiento.

15

La determinación de la presencia o ausencia de dicho SNP puede ser determinada por la secuenciación del ADN, el análisis de PCR o cualquier otro método de genotipificación conocido en el estado del arte. Ejemplos de tales métodos incluyen, pero no se limitan a, ensayos químicos, tales como la hibridación alelo específica, la extensión del cebador ("primer extension"), ligación de oligonucleótidos alelo específica, secuenciación, escisión enzimática, discriminación de 5' (flap) endonucleasa; y métodos de detección, tales como fluorescencia, quimioluminiscencia, y espectrometría de masas. Por ejemplo, la presencia o ausencia de dichos polimorfismos se pueden detectar en una muestra de ADN, preferiblemente después de su amplificación. Por ejemplo, el ADN aislado se puede someter a amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando cebadores de oligonucleótidos específicos para el polimorfismo o que permiten la amplificación de una región que contiene el polimorfismo. Por ejemplo, las condiciones para la hibridación del cebador pueden ser seleccionadas para asegurar la amplificación específica; por lo que la aparición de un producto de amplificación sea indicativo de la presencia del polimorfismo de acuerdo con la invención. Alternativamente, el ADN puede ser amplificado, de manera que el SNP se puede detectar en la secuencia amplificada por hibridación con una sonda adecuada o por secuenciación directa, o cualquier otro método apropiado conocido en la técnica.

25

30

Han sido descritas numerosas estrategias para el análisis de genotipo (Cooper et al., 1991; Grompe, 1993). Por ejemplo, se puede determinar la presencia o ausencia de un sitio de restricción en un ácido nucleico. Cuando un polimorfismo crea o elimina el sitio de reconocimiento de una enzima de restricción, esto permite un genotipado del polimorfismo de manera simple mediante PCR directa. Otras estrategias incluyen, pero no se limitan a, la

5 secuenciación directa, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP); hibridación con oligonucleótidos específicos de alelo (ASO), PCR específica de alelo; PCR usando cebadores mutagénicos; ligasa-PCR, HOT cleavage; electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente (DGGE), electroforesis en gel de gradiente de temperatura

10 (TGGE), polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP) y cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante (Kuklin et al, 1997).

La secuenciación directa puede realizarse por cualquier método conocido en el estado del arte, incluyendo, pero sin limitarse a, secuenciación química, usando el método de Maxam-

15 Gilbert; secuenciación enzimática, utilizando el método de Sanger; pirosecuenciación, secuenciación de espectrometría de masas; secuenciación utilizando arrays; o PCR en tiempo real cuantitativa. Típicamente, el ADN a secuenciar se somete primero a la amplificación por PCR utilizando cebadores de amplificación específicos. Sin embargo, varios otros métodos están disponibles, permitiendo estudiar el ADN independientemente de

20 la reacción de PCR, por ejemplo, la amplificación por círculo rodante (RCA), el ensayo Invader®, o el ensayo de ligación a oligonucleótido (OLA).

Otro procedimiento de cuantificación preferido es la PCR cuantitativa (qPCR). La qPCR o PCR en tiempo real es bien conocida por un experto en la materia. Se comercializan

25 distintos instrumentos para llevar a cabo dicha reacción, tales como ABI Prism 7700 SDS, GeneAmp 5700 SDS, ABI Prism 7900 HT SDS de Applied Biosystems; iCycler IQ de Bio-Rad; Smart Cycler de Cepheid; Rotor-Gene de Corbett Research; LightCycler de Roche Molecular Biochemicals y Mx4000 Multiplex de Stratagene. El procedimiento de qPCR permite la cuantificación exacta del producto de PCR en tiempo real midiendo la

30 acumulación del producto de PCR muy pronto en la fase exponencial de la reacción, reduciendo así el sesgo en la cuantificación ligado a la eficacia de la amplificación de PCR que se produce en la PCR de punto final. La PCR en tiempo real es bien conocida en la técnica y por tanto, no se describe en detalle en el presente documento. Una visión general de la tecnología y los protocolos para qPCR están disponibles, por ejemplo, de los

35 proveedores mencionados anteriormente, por ejemplo, <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/sybr-green-qpcr.html> o

<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/pcr/quantitative-pcr/qpcr-technical-guide.html>. Una revisión del uso de qPCR en la cuantificación de mRNA se encuentra por ejemplo en Wong ML y Medrano JF, *Biotechniques* 2005, 39(1):75-85.

5 Están disponibles diferentes bioquímicas de detección para qPCR. Se pueden usar todas ellas con los instrumentos de qPCR mencionados anteriormente. El término "bioquímica de detección" se refiere a un procedimiento para informar de la amplificación del producto de PCR específico en PCR en tiempo real. Dichas bioquímicas de detección se clasifican en dos grupos principales. El primer grupo comprende moléculas de intercalado de ADN de  
 10 doble cadena: tales como SYBR Green I y EvaGreen; y el segundo grupo incluye oligonucleótidos marcados típicamente con un fluoróforo. Este último, a su vez, se ha dividido en tres subgrupos: (i) cebadores-sondas (Scorpions, Amplifluor®, LUX™, Cyclicons, Angler®); (ii) sondas de hidrólisis (TaqMan, MGB-TaqMan, Snake assay) y de hibridación (Hybprobe or FRET, Molecular Beacons, HyBeacon™, MGB-Pleiades, MGB-Eclipse,  
 15 ResonSense®, Yin-Yang or displacing); y (iii) análogos de ácidos nucleicos (PNA, LNA®, ZNA™, bases no naturales: Plexor™ primer, Tiny-Molecular Beacon), ver E. Navarro et al., *Clinica Chimica Acta*, Volume 439, 15 January 2015, Pages 231–250.

Por ejemplo, dichas sondas son oligonucleótidos pueden ser de doble marcaje, tales como  
 20 sondas de hidrólisis o balizas moleculares. El extremo 5' del oligonucleótido, típicamente, se marca con una molécula indicadora (reporter) fluorescente tales como FAM, TET o JOE mientras que el extremo 3' se marca con una molécula desactivadora (quencher), tales como TAM o BHQ1. La secuencia de la sonda es específica para una región de interés en la molécula diana amplificada. En un modo de realización preferido, dicha sonda es una sonda  
 25 de hidrólisis que está diseñada de modo que la longitud de la secuencia sitúa el fluoróforo 5' y la molécula desactivadora 3' en proximidad suficientemente estrecha para suprimir la fluorescencia. Varias moléculas indicadoras y extintoras para su uso en sondas de qPCR son bien conocidas en la técnica. Estas están disponibles, por ejemplo, de <https://www.eurofinsgenomics.eu/en/dna-rna-oligonucleotides/optimised-application-oligos/qpcr-probes.aspx>.  
 30

Asimismo, la presente invención se refiere a secuencias de oligonucleótidos (cebadores y/o sondas) que hibridan de manera específica con uno de los alelos de los polimorfismos. El término "un cebador y/o sonda" incluye específicamente "cebadores y/o sondas",  
 35 englobando por ejemplo a un cebador, una sonda, un cebador y una sonda, una pareja de cebadores, y una pareja de cebadores y una sonda.

Preferiblemente, una sonda y/o cebador es un secuencia de polinucleótidos de entre 10 y 30 nucleótidos, más preferiblemente de entre 15 y 26 nucleótidos, aún más preferiblemente de entre 18 y 22 nucleótidos, y aún mucho más preferiblemente de alrededor de 20 nucleótidos.

- 5 En una realización particular, dichos cebadores y/o sondas han sido modificados para la detección o para potenciar el rendimiento del ensayo.

En un aspecto relacionado, la invención hace referencia a un método *in vitro* para seleccionar un tratamiento para un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria, en el que dicho método comprende la etapa a) definida más arriba; y además comprende:

- 10 b) seleccionar un agente anti-TNF $\alpha$  cuando el alelo (A) está presente en al menos uno de los alelos en el locus del SNP rs11466657, preferiblemente cuando el alelo (A) está presente en ambos alelos.

En una realización preferida, el sujeto es ACPA positivo. En una realización más preferida, dicho sujeto es una mujer ACPA positivo.

20 Un agente anti-factor de necrosis tumoral (en inglés "tumor necrosis factor", TNF) disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere con la actividad TNF *in vitro* y/o *in vivo*. El término anti-TNF $\alpha$  e inhibidor de TNF $\alpha$  se utilizan de manera intercambiable en la presente memoria. En una realización preferida, dicho agente anti-TNF $\alpha$  es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  específico. Métodos para la obtención de anticuerpos frente a un antígeno conocido son parte del estado del arte y un experto en la materia sabrá como obtener anticuerpos anti-TNF $\alpha$ .

El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio e incluye anticuerpos completamente ensamblados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, diabodies), anticuerpos de dominio único (sdAb) y péptidos recombinantes que comprenden los anteriores, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada. El término "anticuerpo" también se refiere a una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina.

- Los agentes anti-TNF $\alpha$  son bien conocidos en el estado del arte. A modo de ilustración, agentes anti-TNF $\alpha$  incluyen pero no se limitan a agentes anti-TNF $\alpha$  seleccionados del grupo que consiste en etanercept, adalimumab, infliximab, golimumab, certolizumab, rituximab, abatacept, anakinra and tocizumab. En una realización preferida, dicho agente anti-TNF $\alpha$  es infliximab. Singh et al., *Arthritis & Rheumatology*, 2016, 68(1), 1-16 proporciona un manual para el tratamiento de la AR del American College of Rheumatology. En particular, la Tabla 1 proporciona un listado de tratamientos para la AR que incluye agentes anti-TNF $\alpha$ .
- 5**
- 10** En una realización particular, dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad reumática inflamatoria. Preferiblemente, dicha enfermedad reumática inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en artritis, artritis psoriasica, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide juvenil, y espondiloartropatia.
- 15** En otra realización particular, dicha enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa) psoriasis, artritis, artritis psoriasica, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide juvenil, espondiloartropatia, uveítis y enfermedad de Behcet. En una realización preferida, dicha enfermedad inflamatoria es la
- 20** artritis reumatoide.

Un método para el pronóstico y/o determinación de la gravedad de un sujeto que padece una enfermedad inflamatoria

- 25** En un aspecto adicional, la invención hace referencia a un método *in vitro* para determinar la gravedad y/o el pronóstico de la enfermedad en un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria, comprendiendo dicho método la etapa a) definida anteriormente.

- Asimismo, hace referencia a un método *in vitro* para obtener datos útiles para determinar la
- 30** gravedad y/o el pronóstico de la enfermedad en un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria, comprendiendo dicho método la etapa a) definida anteriormente.

- Para cada enfermedad o grupo de enfermedades inflamatorias se han establecido criterios
- 35** por parte de la comunidad clínica para determinar la gravedad o grado de avance y/o actividad de la enfermedad que son bien conocidos por un experto en la materia. Como se

ha descrito más arriba el índice DAS28 y los criterios de la ACR/EULAR se utilizan habitualmente para determinar el grado de severidad de la AR. Por ejemplo se consideran típicamente pacientes con enfermedad grave aquellos que presentan una o más, preferiblemente todas, de las siguientes características: positividad para factor reumatoide (FR) y/o anticuerpos frente a antígenos de proteína citrulinada (ACPA), presencia de erosiones y resistencia (por ejemplo, DAS28  $\geq$  3,2 o intolerancia) a al menos un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (DMARDs en inglés) Agentes DMARDs son bien conocidos en el estado del arte e incluyen por ejemplo, methotrexate, leflunomide, hydroxychloroquine and sulfasalazine. Un experto en la materia entenderá que una mayor severidad o gravedad de la enfermedad está asociada a un peor pronóstico.

De acuerdo con los datos del Ejemplo 2, se ha encontrado una correlación entre la gravedad de la enfermedad y la presencia del alelo (G), en particular la variante I473T está asociada a un aumento de la erosión, especialmente en pacientes ACPA positivos, y a una menor respuesta a agentes anti-TNF $\alpha$  (i.e., infliximab). Así pues, en una realización particular del método de la invención, la presencia del alelo (G) en al menos uno de los alelos en el locus del SNP rs11466657, preferiblemente en ambos alelos, es indicativo de un aumento de gravedad de la enfermedad inflamatoria.

Asimismo, la invención proporciona un método para tratar un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria, en el que dicho método comprende la etapa a) definida anteriormente; y además comprende:

b) administrar a dicho sujeto un agente anti-TNF $\alpha$  cuando el alelo (A) está presente en al menos uno de los alelos en el locus del SNP rs11466657, preferiblemente cuando el alelo (A) está presente en ambos alelos.

En una realización preferida, el sujeto es ACPA positivo. En una realización más preferida, dicho sujeto es una mujer ACPA positivo.

Además, la presente invención hace referencia a un agente anti-TNF $\alpha$  para su uso en un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria, en el que dicho sujeto presenta el alelo (A) en al menos uno de los alelos en el locus del SNP rs11466657, preferiblemente en el que dicho sujeto es homocigoto para el alelo (A).

Los métodos de la presente invención pueden comprender además la determinación de otros biomarcadores asociados a dicha enfermedad inflamatoria, preferiblemente, dichos biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpos anti-proteínas citrulinadas (ACPA), anticuerpos del factor reumatoide (FR), anticuerpos anti-lectina de unión a manosa (MBL), velocidad de sedimentación globular (VSG), proteína C-reactiva (CRP), recuento de plaquetas, los niveles de hemoglobina y el hematocrito. Más detalles sobre dichos biomarcadores se proporcionan por ejemplo en Gupta B et al. *J Autoimmun.* 2006. 27: 125-133, Afzal Net al. *Clin Lab.* 2011. 57: 895-899, Takizawa Y et al. *Ann Rheum Dis.* 2006. 65: 1013-1020, Vossenaar ER et al. *Arthritis Res Ther.* 2004. 6: R142-R150 y EP0175270 que se incorporan a este documento por referencia.

El factor reumatoide (RF) es el autoanticuerpo que primero se identificó en la artritis reumatoide. Se define como un anticuerpo contra la porción Fc de IgG. RF y IgG se unen para formar complejos inmunes que contribuyen a la enfermedad. Por otra parte, los anticuerpos frente a antígenos de proteína citrulinados (ACPA) son autoanticuerpos que se dirigen contra péptidos y proteínas que son citrulinados. Los ACPA están presentes en la mayoría de los pacientes con artritis reumatoide.

En una realización preferida de los métodos de la invención, se determinan también los anticuerpos anti-proteína citrulinados (ACPA).

Opcionalmente, dichos métodos pueden comprender además la determinación de parámetros clínicos. Ejemplos de signos y/o síntomas cuya presencia/ausencia puede determinarse son: rigidez matutina, presencia de artritis en tres o más articulaciones, afectación de las articulaciones de las manos, artritis simétrica, nódulos reumatoides, y los cambios radiográficos (véase la Tabla 1 de Rindfleisch y Muller, y criterios de clasificación de la ACR/EULAR (*Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1580-1588)).

El método de la invención puede comprender además el almacenaje de los resultados obtenidos en dispositivo de almacenamiento de datos. En un modo de realización, dicho dispositivo de almacenamiento de datos es una lámina de papel. En un modo de realización preferente, dicho dispositivo de almacenamiento de datos es un medio legible por ordenador. Como se usa en el presente documento, "un medio legible por ordenador" puede ser cualquier aparato que pueda incluir, almacenar, comunicar, propagar o transportar los resultados de la determinación del procedimiento de la invención. El medio puede ser un sistema (o aparato o dispositivo) electrónico, magnético, óptico, electromagnético, infrarrojo

o semiconductor o un medio de propagación.

Los métodos de la presente invención pueden ser implementados por un ordenador. Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención se refiere a un método implementado por  
 5 ordenador, en el que el método es cualquiera de los métodos descritos en el presente documento o cualquier combinación de los mismos.

Así pues, cualquier programa de ordenador capaz de implementar cualquiera de los métodos de la presente invención o utilizado para implementar cualquiera de estos métodos  
 10 o cualquier combinación de los mismos, también forma parte de la presente invención. Asimismo, cualquier dispositivo o aparato que comprende o que lleva un programa de ordenador capaz de llevar a cabo, o para la aplicación de cualquiera de los métodos de la presente invención o cualquier combinación de los mismos, se incluye también como parte de la presente memoria descriptiva.

15 Finalmente, los métodos de la presente invención pueden aplicarse con los individuos de ambos sexos, es decir, hombres o mujeres, y a cualquier edad. El perfil determinado por la presente invención es predictivo y pronóstico.

#### 20 Kit de la invención y usos del mismo

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un kit para determinar en una muestra biológica aislada de un sujeto el genotipo de uno o más polimorfismos de TLR10 que den lugar a una variante de TLR10 que ha perdido la capacidad de inhibir a NF $\kappa$ B, donde dicho  
 25 kit comprende:

- un reactivo para determinar el genotipo de dichos polimorfismos;
- opcionalmente, instrucciones para el uso de dicho reactivo en la determinación del genotipo de dichos polimorfismos en una muestra biológica aislada.

30 En una realización preferida, la invención hace referencia a un kit para determinar en una muestra biológica aislada de un sujeto el genotipo del SNP rs11466657, que comprende:

- un reactivo para determinar el genotipo del SNP rs11466657;
- 35 – opcionalmente, instrucciones para el uso de dicho reactivo en la determinación del genotipo del SNP rs11466657 en una muestra biológica aislada.

En una realización particular, dicho reactivo es un cebador y/o sonda específico de SEQ ID NO: 1 que amplifica una región que comprende el SNP rs11466657. Típicamente, dicho reactivo incluye un cebador directo parcialmente idéntico, preferiblemente substancialmente idéntico, a un fragmento de SEQ ID NO: 1, y una sonda y/o un cebador inverso es parcialmente complementario, preferiblemente substancialmente complementario, a un fragmento de SEQ ID NO: 1.

Preferiblemente, dicho cebador y/o sonda comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y secuencias idénticas a cualquiera de las mismas en al menos 75%.

Las secuencias oligonucleotídicas con una identidad de al menos un 75 % mencionadas en la presente invención presentan preferiblemente una identidad de al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, más preferentemente, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % con las respectivas secuencias de referencia. Además, estas secuencias con una identidad de al menos un 75 % pueden tener el mismo número de nucleótidos, o bien presentar más o menos nucleótidos que la secuencia de referencia.

En una realización particular, dicho kit comprende reactivos para llevar a cabo una reacción de PCR en tiempo real, que normalmente contiene una ADN polimerasa, tal como TaQ ADN polimerasa, un tampón, magnesio, dNTPs, y opcionalmente otros agentes (por ejemplo, agentes estabilizantes tales como gelatina y albúmina de suero bovino). Además, mezclas de reacción PCR en tiempo real también contienen reactivos para la detección en tiempo real y la cuantificación de los productos de amplificación como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Realizaciones particulares y características preferidas de este aspecto de la invención se han definido en aspectos anteriores.

La invención se refiere también al uso de un kit, tal y como se ha descrito en el aspecto anterior, para predecir la respuesta clínica de un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria, para identificar un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria con riesgo de no responder a un tratamiento con un agente anti-TNF $\alpha$ , para seleccionar un tratamiento para un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria, o para determinar la gravedad y/o el

pronóstico de una enfermedad inflamatoria en un sujeto, en un método de acuerdo con los aspectos anteriores de la invención.

5 Se contempla que cualquier realización comentada en esta memoria descriptiva puede implementarse con respecto a cualquier método, kit y uso de la invención descritos en el presente documento. Se entenderá que las realizaciones particulares descritas en el presente documento se muestran a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención. Las características principales de esta invención pueden emplearse en diversas realizaciones sin apartarse del alcance de la invención. Los expertos en la técnica  
10 reconocerán, o podrán determinar, usando únicamente experimentación de rutina, numerosos equivalentes a los procedimientos específicos descritos en el presente documento. Se considera que tales equivalentes están dentro del alcance de esta invención y se cubren por las reivindicaciones.

15 Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de conocimiento de los expertos en la técnica a la que se refiere esta invención. Todas las publicaciones y solicitudes de patente se incorporan al presente documento como referencia en la misma medida que si se indicara que cada publicación o solicitud de patente individual se incorpora específica e individualmente como referencia.

20 El uso de la palabra "un" o "una" puede significar "uno", pero también concuerda con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno". El uso del término "otro" también puede referirse a uno o más. El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere solo a alternativas  
25 o que las alternativas son mutuamente excluyentes.

Tal como se usa en esta memoria descriptiva y en la(s) reivindicación/reivindicaciones, las palabras "que comprende" (y cualquier forma de comprender, tal como "comprenden" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de tener, tal como "tienen" y "tiene"), "que  
30 incluye" (y cualquier forma de incluir, tal como "incluye" e "incluyen") o "que contiene" (y cualquier forma de contener, tal como "contiene" y "contienen") son incluyentes o de significado abierto y no excluyen elementos o etapas de método adicionales, no citados. El término "comprende" también abarca y da a conocer expresamente los términos "consiste en" y "consiste esencialmente en". Tal como se usa en el presente documento, la expresión  
35 "que consiste esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a los materiales o etapas especificados y a aquellos que no afectan materialmente a la(s) característica(s)

básica(s) y novedosa(s) de la invención reivindicada. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o componente no especificado en la reivindicación exceptuando, por ejemplo, impurezas normalmente asociadas con el elemento o la limitación.

5

El término "o combinaciones de los mismos" tal como se usa en el presente documento se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos enumerados que preceden al término. Por ejemplo, "A, B, C, o combinaciones de los mismos" se pretende que incluya al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y si el orden es importante en un

10

contexto particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Continuando con este ejemplo, se incluyen expresamente combinaciones que contienen repeticiones de uno o más elementos o términos, tales como BB, AAA, AB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, etc. El experto en la técnica entenderá que normalmente no existen límites en el número de elementos o términos en cualquier combinación, a menos que sea evidente de

15

otra manera a partir del contexto.

Tal como se usa en el presente documento, palabras de aproximación tales como, sin limitación, "aproximadamente", "alrededor de", "de manera aproximada" se refieren a una condición que cuando se modifica de ese modo se entiende que no es necesariamente

20

absoluta o perfecta pero podría considerarse lo suficientemente cerca para los expertos habituales en la técnica como para garantizar la designación de que la condición está presente. El grado en que puede variar la descripción dependerá de la medida en que puede instituirse un cambio y de que un experto habitual en la técnica todavía pueda reconocer que

25

el rasgo distintivo modificado todavía tiene las características y capacidades requeridas del rasgo distintivo sin modificar. En general, pero sujeto a la discusión precedente, un valor numérico en el presente documento que se modifica por una palabra de aproximación tal como "aproximadamente" puede variar del valor establecido en  $\pm$  el 1, el 2, el 3, el 4, el 5, el 6, el 7, el 8, el 9, el 10, el 11, el 12, el 13, el 14 o el 15%. Preferiblemente el término "aproximadamente" significa exactamente el valor indicado ( $\pm$  el 0%).

30

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención y no deben interpretarse como limitativos del alcance de la misma.

## EJEMPLOS

**Ejemplo 1.- Material y métodos****1.1 Muestras**

En este trabajo se han incluido dos cohortes de pacientes con AR, una primera cohorte de 5 453 pacientes sin seleccionar con seguimiento en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, España) y el Hospital Universitario La Paz (Madrid, España), y una segunda de 1201 pacientes reclutados por el Consorcio de Enfermedades Inflamatorias Mediadas por el Sistema Inmunitario (España) [Avila-Pedretti G, *et al.*, *PLoS One* 2015, 10(4):e0122088]. La información clínica, incluyendo datos demográficos, características de 10 enfermedad y tratamiento, se resumen en la [tabla 1](#). Todos los pacientes se diagnosticaron según los criterios de clasificación del American College of Rheumatology [Arnett FC, *et al.*, *Arthritis Rheum* 1988, 31(3):315-324]. Como población de control, también se genotiparon 1702 individuos sanos del mismo trasfondo genético (es decir, una población del sur de Europa) [Julia A, *et al.*, *Gut* 2013, 62(10):1440-1445]. Todos los individuos de control se 15 habían examinado para determinar la presencia de una enfermedad autoinmunitaria o antecedentes familiares de trastornos autoinmunitarios, y se excluyeron si eran positivos.

**Tabla 1.** Características principales de dos cohortes de pacientes con AR.

	Cohorte I (n=453)	Cohorte II (n=1.201)
Mujeres (%)	73,1	76,8
Media de edad (años)	65,6 ± 14,5 <sup>a</sup>	46,5 ± 14,5 <sup>a</sup>
Duración del seguimiento (meses)	123,8 ± 91,5 <sup>a</sup>	171,6 ± 123,6 <sup>a</sup>
Manifestaciones extra-articulares (%)	22,2	-
Presencia de daño articular (%)	-	100
Positivo para FR (%)	64,8	74,6
Positivo para ACPA (%)	62,2	74,1
Número de tratamientos previos con DMARDs	2,2 ± 1,5 <sup>a</sup>	1,7 ± 1,5 <sup>a</sup>
Número de terapias biológicas previas	1,8 ± 1,2 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,9 <sup>a</sup>

FR, factor reumatoide; DMARDs, fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad; ACPA, anticuerpos anti-proteínas citrulinadas.

<sup>a</sup>Media ± DE.

**20 1.2 Líneas celulares**

Se mantuvieron células K562 (ATCC, Middlesex, Reino Unido) y U937 (ATCC Middlesex, Reino Unido) en medio RPMI 1640 (Life Technologies, Paisley, Reino Unido) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% (Lonza, Verviers, Bélgica). Se sustituyó el medio cada 2-3 días.

5

### 1.3 Análisis de secuenciación del gen de TLR10

Se secuenciaron los exones codificantes y las regiones flanqueantes del gen de TLR10 en 66 pacientes con AR seleccionados con enfermedad grave. Se consideraron pacientes con enfermedad grave aquellos con positividad para factor reumatoide (FR) y/o anticuerpos frente a antígenos de proteína citrulinada (ACPA), presencia de erosiones y resistencia a al menos un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (DMARDs en inglés) y 30 controles sanos mediante secuenciación de nueva generación (NGS). El FR se midió por nefelometría (BNII, Siemens Healthcare) y el valor de corte 22 UI / ml. Los ACPA se midieron mediante un test ELISA comercial (CCP2, Eurodiagnostica) y se consideraron positivos por encima de 50 U/ml. Se clasificaron como resistentes a DMARDs aquellos que presentaban falta de respuesta en el índice DAS28 ( $\text{DAS28} \geq 3,2$ ) o intolerancia.

15

Las librerías de ADN se procesaron para enriquecimiento híbrido usando un diseño SeqCap EZ (Roche Nimblegen, Basilea, Suiza) que contenía las secuencias codificantes de TLR10. A continuación, se secuenciaron librerías de doble código de barras usando una plataforma MiSeq NGS (Illumina, Madison, WI). Para la secuenciación de Sanger, se extrajo ADN de sangre completa usando el kit para ADN en sangre QIAamp (Qiagen, Hamburgo, Alemania) y se amplificó con cebadores para TLR10 humano (SEQ ID NO: 3): 5'-CATGGCCAGAACTGTGGTC-3' y (SEQ ID NO: 4): 5'-ACCATCCAACCATCATGACC-3'. Se llevó a cabo el análisis de secuencia del fragmento amplificado usando un analizador genético (Applied Biosystems, Foster City, CA).

20

25

### 1.4 Análisis de SNP único

Se analizó la variante I473T de TLR10 (rs11466657; [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=11466657](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=11466657)), en una cohorte independiente de 1201 pacientes con AR y 1493 controles sanos usando la plataforma de genotipado TaqMan® (Assay Id C\_25643390\_30, Life Technologies, Carlsbad, CA). Todas las lecturas de fluorescencia de punto final y reacción de PCR se realizaron usando un sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems). Las

30

condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: 50 ° C durante 2 min y 95 ° C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 92 ° C durante 15 s y 60 ° C durante 1 min. Se estimó el error de genotipado genotipando el 20% de las muestras por duplicado (error <1%) [Lopez-Lasanta M, Julia A, Maymo J, Fernandez-Gutierrez B, Urena-Garnica I, Blanco F.J, Canele JD, Alperi-Lopez M, Olive A, Corominas H *et al*: Variation at Interleukin-6 Receptor Gene Is Associated to Joint Damage in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Res Ther* 2015, 17:242].

### 1.5 Transfecciones para realizar los ensayos de gen indicador

- 10 Se clonó ADNc de TLR10 (NM\_030956; [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_030956.3](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_030956.3); SEQ ID NO: 1) en pCMV6 (Origene, Rockville, MD). La variante I473T se generó mediante mutagénesis dirigida al sitio usando el kit de mutagénesis Quick Change (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) con los siguientes cebadores: SEQ ID NO: 5
- 5'-GGCCTTACGAGAACTAAATACTGCATTTAATTTTCTAACTGATC-3' y SEQ ID NO: 6
- 15 5'-ATCAGTTAGAAAATTAATGCAGTATTTAGTTCTCGTAAGGCC-3'. Se secuenció el injerto modificado para verificar la mutación. Se cotransfectaron células K562 y U937 con 2 µg de constructos de TLR10 de tipo natural o mutante, 1 µg de plásmido pBVI-Luc indicador, que contenía seis repeticiones en tándem de los sitios de reconocimiento de NFκB dentro de la región promotora unida al gen de la luciferasa [Inohara N, *et al.*, *J Biol Chem* 2001, 276(4):2551-2554] y 0,2 µg de pRSV-β-gal usando Lipofectamine 2000 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO).
- 20

### 1.6 Ensayos de gen indicador

- Tras 24 h de transfección, se incubaron las células K562 y U937 con 10 ng/ml y 20 ng/ml de factor de necrosis tumoral-alfa (TNFα) en presencia o en ausencia de 200 µg/ml de infliximab y tras 24 h se prepararon los extractos celulares y se analizaron para determinar la actividad luciferasa relativa mediante un sistema de ensayo de gen indicador Dual-Light (Applied Biosystems). Se normalizaron los resultados para determinar la eficacia de transfección con valores obtenidos con pRSV-β-gal.
- 25

30

### 1.7 Análisis de expresión de genes diana de NFκB

Para evaluar la expresión de genes individuales, se generó un ADN complementario y se amplificó usando cebadores para TNFα humano SEQ ID NO: 7 (5'-CAATGGCGTGGAGCTGAGAG-3' y SEQ ID NO: 8

	5'-GGCTGATGGTGTGGGTGAGG-3'),	CCL2	SEQ	ID	NO:	9	
	(5'-CTCGCTCAGCCAGATGCAAT-3'	y	SEQ	ID	NO:	10	
	5'-GTCTTCGGAGTTTGGGTTTGC-3'),	TRAIL	SEQ	ID	NO:	11	
	(5'-GAGCTGAAGCAGATGCAGGAC-3'	y	SEQ	ID	NO:	12	
<b>5</b>	5'-TGACGGAGTTGCCACTTGACT-3'),	y	β-actina	SEQ	ID	NO:	13
	(5'-GCTGCCTCAACACCTCAAC-3'	y	SEQ	ID	NO:	14	

5'-GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG-3'). Se realizó PCR cuantitativa en tiempo real en un sistema de detección de secuencias 7000 (Applied Biosystems). Se calculó la razón de la abundancia de marcadores de diferenciación con respecto a la de transcritos de β-actina como  $2^n$ , donde  $n$  es el valor de ciclo umbral de β-actina menos el valor de ciclo umbral del ARNm correspondiente y se normalizó por el valor de la muestra con el nivel de expresión más bajo de estos genes. Se determinó la especificidad de los productos de PCR deseados con análisis de curva de fusión.

- 15** La PCR en tiempo real, se llevó a cabo utilizando el Applied Biosystems 7000 Real-Time PCR system (Bio-Rad). Cada reacción de PCR contenía 12,5 µl SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems), 400 nM de cada cebador, y 1 µl cDNA diluido (100 ng) en un volumen total de 25 µl. Las reacciones se realizaron en una placa de reacción de 96 pocillos bajo las siguientes condiciones: 2 min a 60 °C, 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 3 s y 1 min a 60 °C.

El método delta Ct ( $\Delta Ct$ ), se utilizó para el análisis de datos de la matriz de PCR. El valor ( $\Delta Ct$ ) normalizado para cada gen de interés (GOI) se calculó restando el Ct medio de los dos genes de expresión constitutiva ("housekeeping genes") de la Ct de cada GOI. A continuación, el doble delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) para cada GOI se calculó restando el  $\Delta Ct$  medio de cada GOI en el grupo de control de la  $\Delta Ct$  de cada GOI. El factor de cambio ("fold-change") de cada GOI comparado con el grupo de control se calculó como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  del  $\log_{10} 2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### 1.8 Análisis estadístico

- 30** Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa SPSS 20 (IBM, Armonk, Nueva York) y el software R statistical (versión 3.2.0). Se compararon las diferencias en variables cuantitativas entre grupos de pacientes con la prueba de la U de Mann-Whitney, y se usó la estadística de chi-cuadrado para variables categóricas. Se realizó significación estadística entre grupos en análisis *in vitro* usando la prueba de la t de Student bilateral para

datos independientes. Se estableció el nivel de significación en  $p < 0,05$ . Se realizaron análisis de asociación genética usando modelos de regresión lineal y logística. Tal como se ha descrito previamente, las covariantes en estos análisis genéticos incluyeron los años de evolución de la enfermedad y la puntuación de actividad de enfermedad basal (DAS28) para la asociación del genotipo rs11466657 con el nivel de daño articular [Lopez-Lasanta M, Julia A, Maymo J, Fernandez-Gutierrez B, Urena-Garnica I, Blanco FJ, Canete JD, Alperi-Lopez M, Olive A, Corominas H *et al*: Variation at Interleukin-6 Receptor Gene Is Associated to Joint Damage in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Res Ther* 2015, 17:242], y el cambio en DAS28 a las 12 semanas [Acosta-Colman I, Palau N, Tomero J, Fernandez-Nebro A, Blanco F, Gonzalez-Alvaro I, Canete JD, Maymo J, Ballina J, Fernandez-Gutierrez B *et al*: Gwas Replication Study Confirms the Association of Pde3a- Sico1c1 with Anti-Tnf Therapy Response in Rheumatoid Arthritis. *Pharmacogenomics* 2013, 14(7):727-734], respectivamente.

**15 Ejemplo 2.- La variante I473T está asociada con la gravedad de la enfermedad y respuesta al tratamiento en pacientes con AR**

La función de TLR10 es controvertida y su asociación con AR apenas se ha estudiado. Con el fin de evaluar si las variantes de TLR10 contribuyen a modificar el desarrollo de la enfermedad en pacientes con AR, se secuenciaron los exones codificantes del gen de TLR10 en 66 pacientes con AR seleccionados y 30 controles sanos. Tras filtrar las bases que tenían al menos cobertura de secuencia 30X, se identificaron dieciséis variantes (véase la tabla 2 a continuación).

**25 Tabla 2.** Dieciséis variantes alélicas del gen de TLR10 encontradas mediante NGS en poblaciones control y con AR. REF, alelo de referencia; ALT, alelo alternativo; MAF, frecuencia de alelo minoritario; (+) cambio dañino; (-) sin cambio dañino; nr, sin registro.

ID de SNP de referencia	REF	ALT	MAF	valor de P	Cambio de AA	Clase funcional	Predicción mediante SIFT	Predicción mediante SNPs3D
rs10776482	A	G	0,29	0,2306	D809	SILENTE	nr	nr
rs4129008	C	T	0,01	0,5652	R799Q	CONTRASEN TIDO	-	-

ID de SNP de referencia	REF	ALT	MAF	valor de P	Cambio de AA	Clase funcional	Predicción mediante SIFT	Predicción mediante SNPs3D
rs4129009	T	C	0,271	0,1889	I775V	CONTRASEN TIDO	-	-
rs10776483	A	G	0,302	0,3296	H724	SILENTE	nr	nr
rs11466658	G	A	0,026	0,1599	R525W	CONTRASEN TIDO	-	-
rs11466657	A	G	0,089	0,04327	I473T	CONTRASEN TIDO	+	+
rs11096955	T	G	0,422	0,07296	I369L	CONTRASEN TIDO	-	-
rs11096956	C	A	0,292	0,3918	P344	SILENTE	nr	nr
rs11466653	A	G	0,026	0,5824	M326T	CONTRASEN TIDO	-	nr
rs11466652	T	C	0,13	0,1403	K303	SILENTE	nr	nr
rs11466651	C	T	0,026	0,5824	V298I	CONTRASEN TIDO	-	-
rs11096957	T	G	0,438	0,015	N241H	CONTRASEN TIDO	-	-
rs11466650	A	G	0,0005	0,137	L167P	CONTRASEN TIDO	+	+
rs11466649	C	A	0,026	0,5824	A163S	CONTRASEN TIDO	-	-
rs10856837	C	T	0,026	0,5824	T37	SILENTE	nr	nr
rs10856838	A	T	0,146	0,5813	I13	SILENTE	nr	nr

Entonces, se realizó una selección basándose en las frecuencias alélicas en ambas poblaciones de pacientes y de control y el impacto funcional previsto sobre la proteína usando los programas SIFT (Ng PC and Henikoff S, *Nucleic Acids Res.* 2003, 31(13):3812-4) y SNPs3D (Yue et al., *BMC Bioinformatics.* 2006, 7:166). La mayoría de los cambios contrasentido encontrados se situaron en los dominios LRR (figura 1A). Como resultado del procedimiento de selección, se identificó la variante I473T (Tabla 2) para estudios de asociación adicionales. Primero, se estudió una población de 453 pacientes y se encontró que las frecuencias de genotipo (el 86,6% de AA, el 11,9% de AG, el 1,5% de GG) no eran significativamente diferentes de las de una población de 209 controles (el 84,5% de AA, el 14,3% de AG, el 1,2% de GG). Después se analizaron varios hallazgos clínicos en la

población de pacientes asociados con la gravedad de la enfermedad, incluyendo la presencia de autoanticuerpos típicos de AR (RF y ACPA), manifestaciones extra-articulares y la necesidad de tratamientos biológicos específicos y cirugía. Todos ellos indicaron una correlación tendencial entre la gravedad y el genotipo GG que no se observó con el genotipo AA (figura 2A). Para reforzar esta observación, se estudió una cohorte mayor de 1201 pacientes con AR y 1493 controles sanos. Tal como se observó previamente, se encontró que la distribución de genotipos era similar en ambas poblaciones de pacientes y de control (figura 1B), lo que es concuerda con los genotipos descritos para la población europea en la base de datos HapMap (Nature. 2005, 437(7063):1299-320; figura 1C). Resulta interesante, tal como se muestra en la figura 2B, que la variante I473T está altamente asociada con enfermedad erosiva en AR positiva para ACPA ( $p=0,017$  en la cohorte total y  $p=0,0049$  en pacientes femeninos) y con una respuesta menor al tratamiento con infliximab medido mediante el cambio en el índice DAS28 ( $p=0,012$  en la cohorte total) así como mediante los criterios de respuesta de la EULAR ( $p=0,025$  en la cohorte total), lo que indica que esta variante selecciona un grupo de pacientes con una enfermedad más grave.

### **Ejemplo 3.- La variante I473T modifica la capacidad regulatoria de NFκB de TLR10**

Basándose en un modelo de estructura 3D usando el visor Jmol (Nepomnyachiy S1, et al., Structure. 2015 May 5;23(5):941-8; figura 3A), la posición 473 está dentro de una cadena-beta en el dominio LRR18 y está ocupada por una isoleucina, un aminoácido altamente hidrófobo, escondida dentro del núcleo de la proteína. En la variante de TLR10, se sustituye isoleucina por treonina, un aminoácido polar que puede participar en puentes de hidrógeno y se sitúa habitualmente en la superficie de la proteína. Los dominios LRR proporcionan marco destacado para lograr diversas interacciones de proteínas. Por tanto, este cambio estructural disminuye los contactos hidrófobos y puede alterar interacciones proteína-proteína funcionalmente relevantes. Se sabe que los miembros de la familia de TLR son reguladores de la actividad de NFκB, una ruta clave en la inflamación. Para demostrar experimentalmente las consecuencias funcionales de la variante I473T sobre la activación de NFκB, se introdujo el nucleótido de alteración de codón en un constructo que contenía ADNc de TLR10 mediante mutagénesis dirigida al sitio y se estudió la capacidad de esta variante para modificar la actividad transcripcional de NFκB. Tal como se muestra en las figuras 3B y 3C, TLR10 de tipo natural regula por disminución la actividad transcripcional de NFκB tanto en condiciones no estimuladas como en condiciones estimuladas por TNFα en las líneas celulares hematopoyéticas K562 y U937. Sin embargo, la sustitución de I473T bloquea la capacidad de inhibición de TLR10. Con el fin de trasladar la respuesta reducida a

infiximab en pacientes al modelo *in vitro*, se estimularon células con  $TNF\alpha$  en presencia o en ausencia de infiximab. En consecuencia, las células que expresaban la variante I473T tenían un nivel de actividad de  $NF\kappa B$  más alto que permanecía tras el tratamiento con infiximab en comparación con células que expresaban la variante de tipo natural (figuras 3D y 3E). Después, se confirmó este resultado analizando la expresión de genes diana de  $NF\kappa B$ . Los niveles de expresión de CCL2, TRAIL y  $TNF\alpha$  se regularon por disminución en presencia de TLR10 de tipo natural tras la estimulación de la ruta de  $NF\kappa B$  con  $TNF\alpha$ . En línea con los resultados previos, se anuló la regulación por disminución de genes diana de  $NF\kappa B$  cuando se transfectaron las células con el constructo que contenía la variante y se cultivaron con  $TNF\alpha$  (figura 4A-E). La expresión de CCL2 también confirmó que la variante genera una menor respuesta a infiximab (figura 4F).

En conclusión, la variante I473T conduce a una capacidad reducida de TLR10 para inhibir la activación de  $NF\kappa B$  en respuesta a estímulos inflamatorios. Este efecto podría explicarse debido a que el cambio de aminoácido disminuye la hidrofobicidad de un dominio LRR, lo que puede alterar la interacción con proteínas TLR necesaria para la señalización de TLR10 [Govindaraj RG, *et al.*, *PLoS One* 2010, 5(9):e12713].

## REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para predecir la respuesta clínica de un sujeto, que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria, a un agente anti-TNF $\alpha$ , en el que dicho método comprende:

a) determinar en una muestra biológica aislada de dicho sujeto el genotipo del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) rs11466657;

donde la presencia del alelo (G) en al menos uno de los alelos en el locus del SNP rs11466657 indica un mayor riesgo de no responder al agente anti-TNF $\alpha$ ; y

donde dicha enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, artritis psoriasica, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide juvenil, espondiloartropatia, uveítis y enfermedad de Behcet's.

2. Método *in vitro* para identificar un sujeto, que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria, que presenta un mayor riesgo de no responder al tratamiento con un agente anti-TNF $\alpha$ , en el que dicho método comprende la etapa a) según la reivindicación 1;

donde la presencia del alelo (G) en al menos uno de los alelos en el locus del SNP rs11466657 indica un mayor riesgo de no responder al agente anti-TNF $\alpha$ ; y

donde dicha enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, artritis psoriasica, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide juvenil, espondiloartropatia, uveítis y enfermedad de Behcet's.

3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la presencia del alelo (G) en ambos alelos indica un mayor riesgo de no responder al agente anti-TNF $\alpha$ .

4. Método *in vitro* para seleccionar un tratamiento para un sujeto, que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria, en el que dicho método comprende la etapa a) según la reivindicación 1; y además comprende:

b) seleccionar un agente anti-TNF $\alpha$  cuando el alelo (A) está presente en ambos alelos en el locus del SNP rs11466657;

5 donde dicha enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, artritis psoriasica, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide juvenil, espondiloartropatia, uveítis y enfermedad de Behcet's.

10

5. Método *in vitro* para determinar la gravedad y/o el pronóstico de la enfermedad en un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria, donde dicho método comprende la etapa a) según la reivindicación 1;

15

donde la presencia del alelo (G) en al menos uno de los alelos en el locus del SNP rs11466657 es indicativo de enfermedad severa; y

20

donde dicha enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, artritis psoriasica, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide juvenil, espondiloartropatia, uveítis y enfermedad de Behcet's.

25

6. El método según la reivindicación 5 donde la presencia del alelo (G) en ambos alelos es indicativo de enfermedad severa.

30

7. Método *in vitro* para obtener datos útiles para determinar la respuesta clínica de un sujeto, que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria, a un agente anti-TNF $\alpha$ , la gravedad y/o el pronóstico de dicha enfermedad donde dicho método comprende la etapa a) según la reivindicación 1;

35

donde dicha enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, artritis psoriasica, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide juvenil, espondiloartropatia, uveítis y enfermedad de Behcet's.

8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el sujeto es positivo para anticuerpos anti-péptido citrulinado (ACPA).

9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la muestra biológica es una muestra de sangre.
- 5 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el genotipo de SNP rs11466657 se determina mediante secuenciación directa o PCR cuantitativa.
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho método además comprende almacenar los resultados del método en un dispositivo de  
10 almacenamiento de datos.
12. Método implementado por ordenador, en el que el método es tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 15 13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde dicho agente anti-TNF $\alpha$  es seleccionado del grupo que consiste en etanercept, adalimumab, infliximab, golimumab, certolizumab, rituximab, abatacept, anakinra and tocizumab. .
- 20 14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde dicho agente anti-TNF $\alpha$  es infliximab.
- 25 15. Uso de infliximab en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un sujeto, que tiene o se sospecha que tiene dicha enfermedad inflamatoria, en el que dicho sujeto presenta el alelo (A) en ambos alelos en el locus del SNP rs11466657,
- 30 donde dicha enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, artritis psoriasica, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide juvenil, espondiloartropatia, uveitis y enfermedad de Behcet's.
16. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14o el uso de infliximab según la reivindicación 15, en el que dicha enfermedad inflamatoria es la artritis reumatoide.



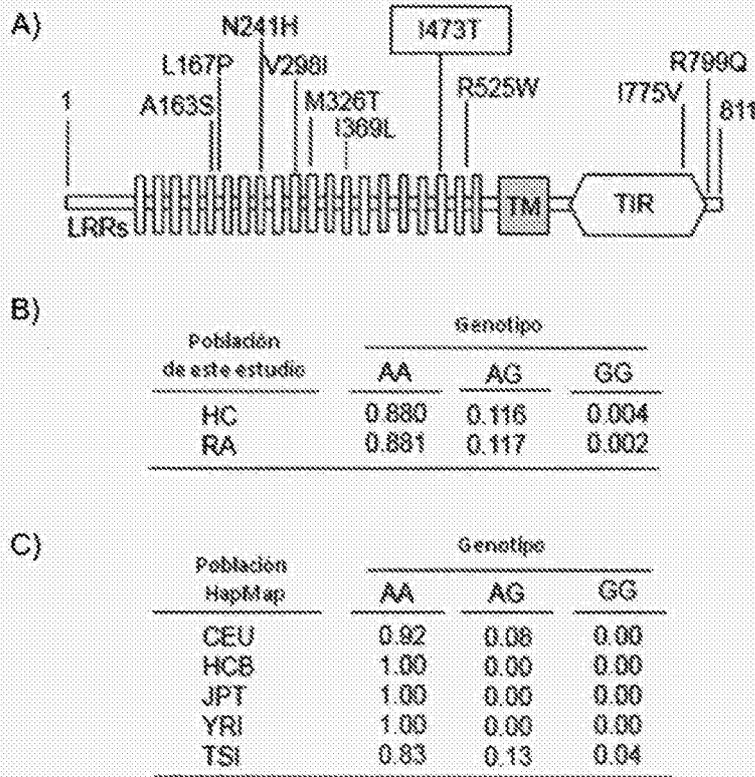


FIG. 1

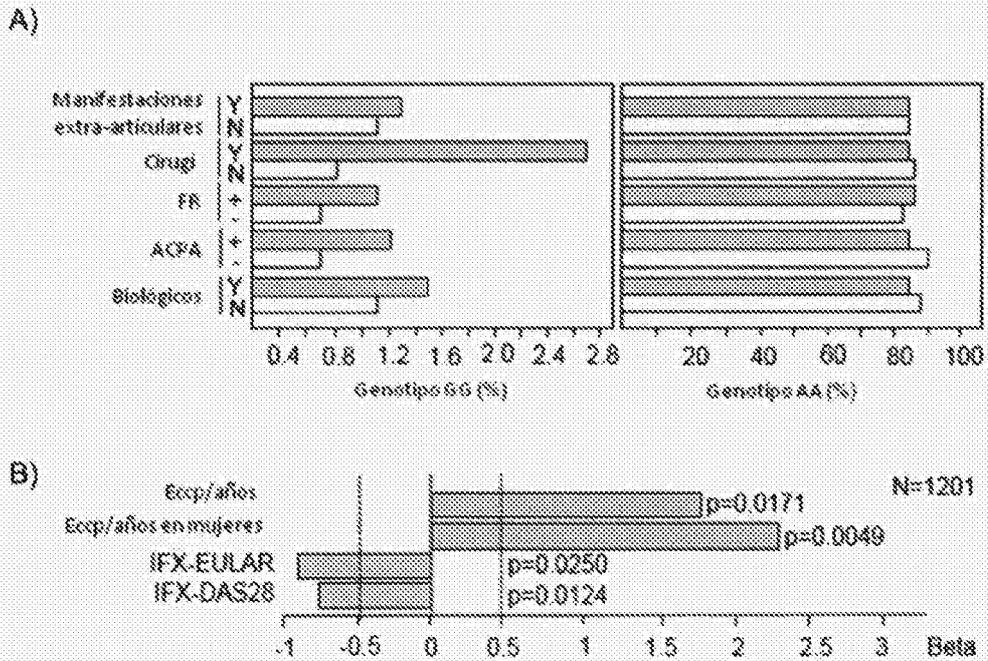


FIG. 2

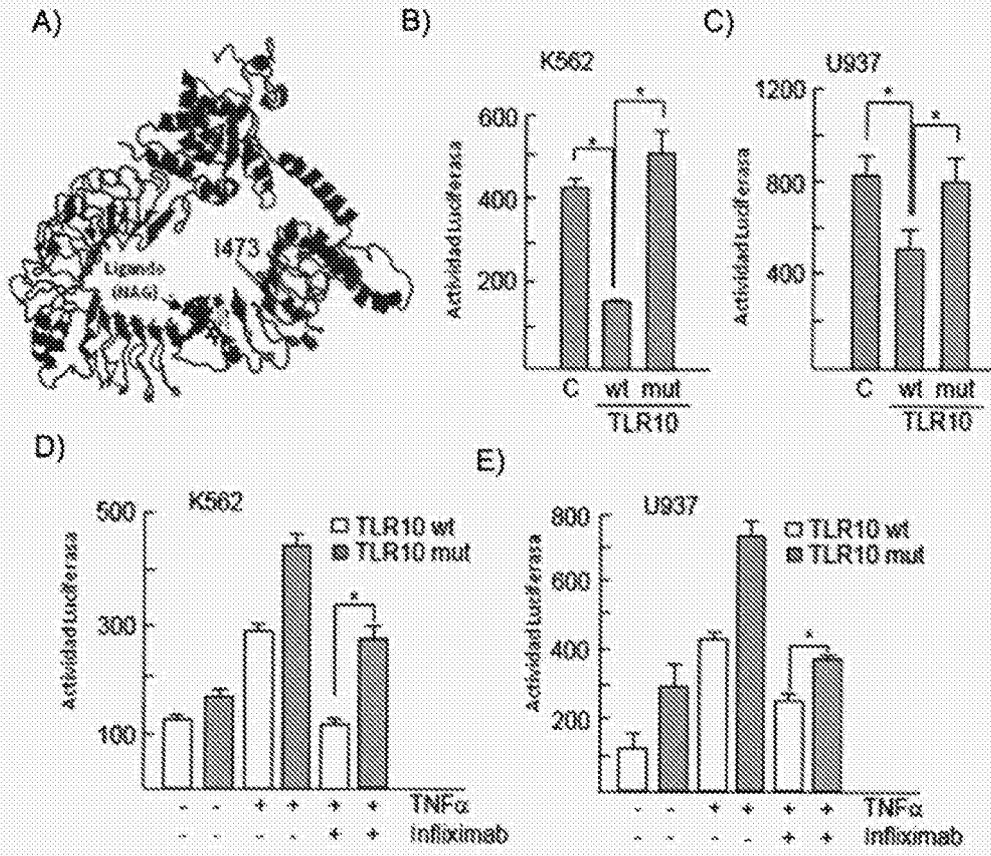


FIG. 3

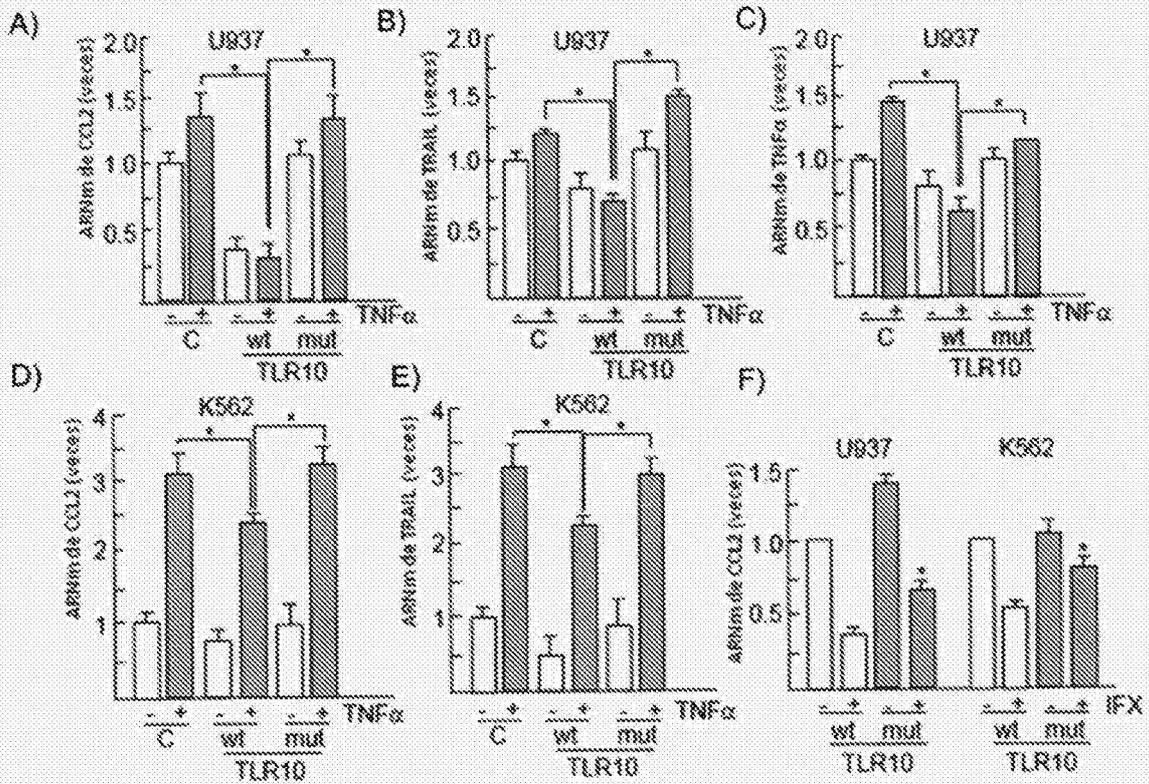


FIG.4