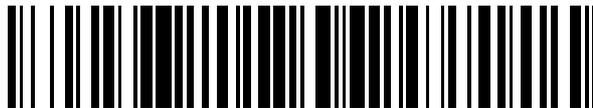


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 793**

21 Número de solicitud: 201430364

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

17.03.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.10.2015

Fecha de la concesión:

30.06.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

07.07.2016

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070182

73 Titular/es:

**FUNDACION PARA LA INVESTIGACION
BIOMEDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA
PRINCESA (51.0%)
C/ DIEGO DE LEON 62
28006 MADRID (Madrid) ES y
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(49.0%)**

72 Inventor/es:

**GONZALEZ ALVARO, Isidoro;
ORTIZ GARCIA, Ana Maria;
LAMANA DOMINGUEZ, Amalia;
PEREZ GOMARIZ, Rosa;
MARTINEZ MORA, Maria Del Carmen;
LECETA MARTINEZ, Javier y
JUARRANZ MORATILLA, Yasmina**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

54 Título: **MÉTODO PRONÓSTICO DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES MEDIANTE EL GENOTIPADO DE VARIANTES GENÉTICAS DEL PÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO**

57 Resumen:

Método pronóstico de enfermedades autoinmunes mediante el genotipado de variantes genéticas del péptido intestinal vasoactivo.

La presente invención se refiere a un método de pronóstico de determinación de la gravedad de enfermedades autoinmunes, por ejemplo, artritis reumatoide, espondiloartritis y lupus eritematosos sistémico, caracterizado por comprender la detección de ciertos polimorfismos genéticos del gen VIP, entre los que se encuentran rs35643203, rs71575932 y/o rs7755568. También el método de la invención es útil para establecer un tratamiento personalizado del paciente. También se refiere al uso de los polimorfismos genéticos del gen VIP descritos en la invención como biomarcadores de dichas enfermedades, así como a un kit que comprende primers o sondas para la detección de dichos polimorfismos y a su uso para el mismo fin.

ES 2 548 793 B1

Método pronóstico de enfermedades autoinmunes mediante el genotipado de variantes genéticas del péptido intestinal vasoactivo

DESCRIPCIÓN

5

La presente invención se refiere a un método pronóstico de enfermedades autoinmunes que comprende la detección de polimorfismos genéticos del gen del péptido intestinal vasoactivo (VIP). Por lo tanto, la presente invención se podría encuadrar en el campo de la biomedicina.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

15

Las enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide (AR), la psoriasis, la enfermedad inflamatoria intestinal, la espondiloartritis o el lupus eritematoso sistémico, comparten una serie de mecanismos etiopatogénicos que ha hecho que se las denomine globalmente como “enfermedades inflamatorias mediadas por mecanismos inmunes” (EIMMI) y también comparten su respuesta a tratamientos inmunomoduladores o inmunosupresores similares o iguales. La AR es la enfermedad reumática autoinmune más común.

20

La AR provoca inflamación crónica de la membrana sinovial de las articulaciones diartrodiales, lo cual causa su progresivo deterioro, y como consecuencia, provoca una discapacidad y deterioro de la calidad de vida del paciente. Además, con cierta frecuencia se acompaña de manifestaciones sistémicas y de un aumento en el número de comorbilidades e incluso de la mortalidad en comparación con la población general. Su etiología se considera de origen multigénico con una importante interacción con factores ambientales. Su prevalencia oscila entre un 0,3 y un 1%, siendo por ejemplo en España la prevalencia de un 0,5%, lo que supone unos 200.000 pacientes con AR en dicho país. Dada su capacidad para producir incapacidad funcional, la AR es una de las principales causas de incapacidad laboral permanente en España. Por tanto, se trata de una enfermedad con una gran relevancia económica y social.

30

35

Las espondiloartropatias son un grupo heterogéneo de enfermedades que comparten manifestaciones clínicas y radiológicas, de las cuales la espondilitis anquilosante es la

más prevalente. Se caracterizan por la presencia de inflamación de las articulaciones de la columna y las sacroilíacas, así como su asociación a la presencia del HLA-B27, lo que condiciona su asociación familiar y una serie de mecanismos patogénicos comunes. Aunque la prevalencia de la espondilitis anquilosante es menor que la de la AR, también tiene una importante capacidad para deteriorar la capacidad funcional de los pacientes, lo que también conlleva altos costes sociales, especialmente derivados de la incapacidad laboral que provocan, ya que afecta a pacientes de menor edad.

Por otra parte, el lupus eritematosos sistémico es una enfermedad muy heterogénea que se caracteriza por una activación del sistema inmune en su vertiente humoral lo que condiciona la aparición de autoanticuerpos, comúnmente anticuerpos antinucleares, anti-DNA y otros. Su expresión clínica es muy variable desde formas clínicamente leves e incluso silentes hasta formas catastróficas con afectación de órganos vitales como el riñón, cerebro, corazón o pulmones. Su prevalencia es menor que la de las dos EIMMI descritas previamente y afecta mayoritariamente a mujeres jóvenes.

Durante los últimos años se ha ido acumulando evidencias que demuestran que el inicio de tratamiento precoz con fármacos modificadores de la enfermedad (FAME) permite un mejor control de las EIMMI. Aun así, muchos pacientes no alcanzan el estado ideal de remisión, probablemente porque no se establece un tratamiento lo suficientemente intenso desde el inicio, por no poderse determinar la gravedad con la que va a cursar la enfermedad.

Por todo ello, se hace necesaria la búsqueda de elementos que permitan determinar cuál va a ser el curso evolutivo de la enfermedad y que, por tanto, permitan determinar precozmente la intensidad del tratamiento adecuada para cada paciente, asumiendo los riesgos de los tratamientos más agresivos para pacientes que vayan a tener un peor pronóstico y evitando estos tratamientos agresivos en los pacientes que vayan a tener una forma leve de la enfermedad. En este sentido ya se han realizado algunos estudios sobre cuantificación de determinadas proteínas o péptidos en fluidos biológicos, entre los que se encuentra el VIP (por ejemplo, Martínez C *et al.* 2014 PLOS One 1:e85248) sin embargo, los métodos de cuantificación utilizados hasta la fecha tienen una mala reproducibilidad interensayo, de modo que se hace necesario un método más fiable y reproducible. En lo que respecta a VIP, no se han observado

variantes genéticas asociadas a un mayor riesgo para padecer enfermedades autoinmunes. De hecho, puede ocurrir que variantes genéticas de determinadas moléculas incidan en el riesgo de desarrollar las enfermedades autoinmunes, pero no influyan en el curso evolutivo de las mismas y, por el contrario, que moléculas cuya variabilidad genética no influye en el riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune, sí modulen su gravedad. En este sentido, se han realizado estudios de variantes genéticas de diversos genes con la asociación al pronóstico en la AR (por ejemplo WO2008010085), aunque no hay resultados definitivos y, en concreto, no se ha estudiado previamente el gen de VIP desde el punto de vista de la predicción pronóstica. Así pues, se hace necesaria la búsqueda de marcadores reproducibles que permitan una mejor determinación del pronóstico de las enfermedades autoinmunes, o que puedan suponer alternativas o complementen los biomarcadores ya disponibles para detectar a pacientes que respondan mejor o peor a un determinado tratamiento, lo cual permitiría ahorrar tiempo y costes en el manejo de las EIMMI.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente invención se han determinado variantes genéticas del gen *VIP* que se asocian a un mayor riesgo de tener un mal curso evolutivo de enfermedades autoinmunes, ejemplificado por la artritis reumatoide, espondiloartritis y lupus eritematoso sistémico, y necesitan de un tratamiento más intenso a lo largo de su seguimiento. Dichas variantes genéticas se asocian a un bajo nivel sérico del péptido VIP.

En la presente invención se demuestra la utilidad de varios polimorfismos ("single nucleotide polymorphisms", SNP) del gen *VIP*, en concreto los SNPs rs35643203, rs71575932 y/o rs7755568 en el pronóstico de artritis reumatoide. Los autores han demostrado que rs35643203, rs71575932 y rs7755568 están en desequilibrio de ligamiento, por lo que los tres resultan informativos para la presente invención. Además de estos SNPs, se ha demostrado que si se utilizan rs3823082 y/o rs688136 también se puede pronosticar la gravedad de la enfermedad. También los polimorfismos rs12213214, rs60946248, rs140023105, rs7764067, rs12201030, rs74760293, rs149081483 y rs12201140; o cualquiera de sus combinaciones; en combinación con los anteriores resulta de utilidad. Además, en la presente invención

se muestran resultados para otras enfermedades inflamatorias mediadas por mecanismos inmunes (EIMMI), como son la espondiloartritis y el lupus eritematoso sistémico, demostrándose que los resultados obtenidos para AR son extrapolables a otras EIMMI. Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método de pronóstico de una enfermedad autoinmune, como por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, espondiloartritis (por ejemplo, la espondilitis anquilosante) o el lupus eritematoso sistémico. También se refiere a un método para establecer un tratamiento personalizado del paciente que presenta una EIMMI.

10 Por lo tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el pronóstico de una enfermedad autoinmune que comprende la detección de los polimorfismos genéticos del gen “péptido intestinal vasoactivo” (VIP) rs35643203, rs71575932 y/o rs7755568 en una muestra biológica aislada de un sujeto que padece una enfermedad autoinmune. En adelante nos referiremos a éste como al
15 “método primero de la invención”.

En la presente invención se entiende por “pronóstico” la capacidad de determinar en pacientes de una enfermedad autoinmune cómo va a evolucionar dicha enfermedad en cuanto a su gravedad. El término “pronóstico” también se refiere a la capacidad de detectar sujetos ya diagnosticados de una enfermedad autoinmune con alta probabilidad de sufrir un empeoramiento de la enfermedad. Esta mala evolución o “mal pronóstico” puede definirse como una menor posibilidad de alcanzar la remisión de la enfermedad, teniendo en cuenta que el experto en la materia conoce que existen múltiples formas de definir este estado ideal de remisión en cada enfermedad. Por ejemplo en la artritis reumatoide existen diferentes formas de definir el estado ideal de remisión, como por ejemplo aunque sin limitarse los descritos en Felson *et al.* Arthritis Rheum 2011;63:573-586. Otras situaciones que también pueden considerarse mala evolución o mal pronóstico son no alcanzar un estado de mínima actividad de la enfermedad (Wells *et al.* J Rheumatol 2005;32:2016-2024) o como la posibilidad de tener peor respuesta terapéutica bien según criterios ACR20, 50 o 70 (Felson *et al.* Arthritis Rheum 1995;38:727-735) o según criterios de la Liga Europea Contra el Reumatismo (*European League Against Rheumatism* o (EULAR) (van Gestel *et al.* Arthritis Rheum 1996;39:34-40). También se entiende por “mal pronóstico” en la presente invención a tener mayor probabilidad de necesidad de un tratamiento más intenso, por ejemplo en el caso de la AR a la necesidad de una terapia combinada de
35

fármacos FAME, independientemente de que uno de los fármacos sea biológico o no. Y también se entiende por “mal pronóstico” a un aumento en la probabilidad de mayor destrucción articular según la evaluación radiográfica para el caso de la AR.

- 5 En el caso de espondilitis anquilosante se considera “mal pronóstico” no alcanzar la remisión definida según los puntos de corte de los siguientes índices para la evaluación de la actividad: BASDAI<2 (Juanola Roura X *et al.* Reumatol Clin 2011;7:113-23) o ASDAS<1,3 (Machado P *et al.* Ann Rheum Dis 2011;70:47-53). También se entiende por “mal pronóstico” la necesidad de iniciar tratamiento con
10 terapia biológica o tener progresión del daño estructural evaluado bien por radiología simple o resonancia magnética.

- Para lupus eritematoso sistémico la definición de “mal pronóstico” como bien lo conoce el experto en la materia, es más compleja, ya que esta es una enfermedad
15 mucho más heterogénea y la actividad clínica se mide más por brotes, considerando como tal, por ejemplo, tener un índice SLEDAI>3 (Calvo-Alén J *et al.* Reumatología Clin 2013; 9: 281-296). No obstante, la gravedad de la enfermedad puede depender del órgano afectado. De manera que estando la enfermedad activa, las formas de la enfermedad que afectan a órganos vitales (corazón, riñón, cerebro) serían más graves
20 desde el punto de vista vital que otras con afectación de órganos no vitales como las articulaciones o la piel. Otra forma de evaluar el mal pronóstico sería la refractariedad a varios tratamientos y el requerimiento de tratamiento más intenso.

- Se entiende por lo tanto como “buen pronóstico” lo contrario a lo anteriormente
25 descrito, es decir, una mayor probabilidad de alcanzar un estado de remisión o mínima actividad de la enfermedad, o bien ser capaz de conseguir una adecuada respuesta terapéutica según los criterios antes definidos o también se refiere a una remisión espontánea de la enfermedad.

- 30 El pronóstico debe ser realizado, de forma preferible, aunque sin limitarse, en el primer año del inicio de los síntomas de la enfermedad autoinmune, incluso antes de que se establezca el diagnóstico definitivo de la enfermedad. De cualquier forma, el método también puede ser aplicado a lo largo de cualquier momento del desarrollo de la enfermedad.

35

Se entiende por “VIP” en la presente invención aquel gen que presenta capacidad de codificar para el “péptido intestinal vasoactivo” o “VIP”. El gen puede ser, por ejemplo, aunque sin limitarse, el gen *VIP* con número de acceso al GenBank del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) AH003027. El VIP en la presente invención se refiere al péptido con número de acceso al GenBank del NCBI AAB22264.1 de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 (HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN).

El término “polimorfismo genético” se refiere a una variación en la secuencia de nucleótidos de la cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN o DNA, “desoxirribonucleic acid”) que tiene al menos una frecuencia del 1% en los individuos de una población. Los polimorfismos genéticos pueden ser variaciones de uno o varios nucleótidos. El polimorfismo de un solo nucleótido, “*single nucleotide polymorphism*” o SNP, generalmente da lugar a dos alelos distintos. Los SNPs o polimorfismos pueden contener información sobre la variación de un solo polimorfismo o la información de un haplotipo si son SNP etiquetas o “tag-SNP”. En la presente invención los términos “polimorfismo” y “SNP” se utilizan de manera indistinta.

En la presente invención se demuestra que los polimorfismos rs35643203, rs71575932 y rs7755568 están en desequilibrio de ligamiento, es decir, son polimorfismos marcadores de una región genómica que se encuentra dentro de un determinado bloque haplotípico.

Se entiende por “haplotipo”, una combinación de alelos de diferentes loci de un cromosoma que son transmitidos juntos. Un haplotipo puede ser un locus, varios loci, o un cromosoma entero dependiendo del número de eventos de recombinación que han ocurrido entre un conjunto dado de loci. Los alelos transmitidos de la madre forman el haplotipo materno, mientras que los alelos del padre forman el haplotipo paterno. También se refiere a un conjunto de polimorfismos (SNPs) que se heredan en bloque con unas medidas de desequilibrio de ligamiento $r^2 \geq 0,90$ y que se identifican mediante el genotipado de uno de los polimorfismos incluidos en dicho haplotipo.

En la presente invención, los polimorfismos genotipados rs35643203, rs71575932 y rs7755568 pertenecen al mismo bloque haplotípico según los resultados obtenidos (es decir, son Tag-SNPs). Cualquier variante genética que se encuentre dentro del mismo

bloque haplotípico que estos Tag-SNPs genotipados se heredará conjuntamente con éstos con una alta probabilidad.

5 Los polimorfismos dentro de un bloque haplotípico están en desequilibrio de ligamiento. “Desequilibrio del ligamiento” (LD del inglés “*linkage disequilibrium*”) es la propiedad de algunos loci de no segregar de forma independiente, es decir, poseen una frecuencia de recombinación menor del 50%.

10 En la presente invención el término “alelo menor” se refiere al alelo que menor representación tiene en la población, tal y como lo conoce el experto en la materia y por lo tanto, el término “alelo mayor” se refiere al alelo más frecuente en la población.

15 Se entiende por polimorfismo rs35643203 a la sustitución C>T (en la hebra complementaria la sustitución sería G>A) en la posición 153072433 localizada en el intrón 1 del gen *VIP*.

20 Se entiende por polimorfismo rs71575932 a la sustitución A>G (en la hebra complementaria la sustitución sería T>C) en la posición 153075844 localizada en el intrón 3 del gen *VIP*.

Se entiende por polimorfismo rs7755568 a la sustitución T>A (en la hebra complementaria la sustitución sería A>T) en la posición 153076955 localizada en el intrón 4 del gen *VIP*.

25 El término “muestra biológica” en la presente invención se refiere a cualquier muestra que permita determinar los polimorfismos de *VIP* del individuo del que se ha obtenido dicha muestra, e incluye, pero sin limitarnos, fluidos biológicos de un individuo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. La muestra biológica comprende ácido desoxirribonucleico (ADN)
30 genómico. La muestra biológica podría ser, por ejemplo, pero sin limitarse, una muestra de fluido, como sangre, plasma, suero, saliva, orina, líquido sinovial o linfa. También puede ser una muestra de tejido. Otras muestras de interés serían por ejemplo células mononucleares de sangre periférica, por ejemplo linfocitos T. La muestra biológica además se puede provenir de extracciones realizadas de forma
35 rutinaria en análisis que se pueden realizar periódicamente a los pacientes.

La muestra biológica en la presente invención puede ser fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina.

- 5 En la presente invención el término “sujeto”, “individuo” y “paciente” se usan indistintamente. Preferiblemente el sujeto es un humano.

10 Una realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere al método que además comprende la detección del polimorfismo genético rs3823082 del gen *VIP* y/o del rs688136.

15 Se entiende por polimorfismo rs3823082 a la sustitución C>T (en la hebra complementaria la sustitución sería G>A) en la posición 153074322 localizada en el intrón 2 del gen *VIP*.

20 Se entiende por polimorfismo rs688136 a la sustitución T>C (en la hebra complementaria la sustitución sería A>G) en la posición 153080061 localizada en el exón 7 del gen *VIP* que corresponde a la región 3' UTR de su mRNA.

25 Una realización más preferida del primer aspecto de la invención se refiere al método que además comprende la detección de al menos uno de los polimorfismos genéticos del gen *VIP* que se selecciona de la lista que comprende: rs12213214, rs60946248, rs140023105, rs7764067, rs12201030, rs12201140, rs74760293 y rs149081483; o cualquiera de sus combinaciones, en una muestra biológica aislada de un sujeto.

30 Se entiende por polimorfismo rs12213214 a la sustitución C>A (en la hebra complementaria la sustitución sería G>T) en la posición 153070786 localizada en el promotor del gen *VIP*.

35 Se entiende por polimorfismo rs60946248 a la sustitución C>T (en la hebra complementaria la sustitución sería G>A) en la posición 153071195 localizada en el promotor del gen *VIP*.

Se entiende por polimorfismo rs140023105 a la sustitución A>G (en la hebra complementaria la sustitución sería T>C) en la posición 153072056 localizada en el exón 1 del gen *VIP* que se corresponde con la región 5' UTR de su mRNA.

5 Se entiende por polimorfismo rs7764067 a la sustitución A>T (en la hebra complementaria la sustitución sería T>A) en la posición 153074199 localizada en el intrón 2 del gen *VIP*.

10 Se entiende por polimorfismo rs12201030 a la sustitución A>G (en la hebra complementaria la sustitución sería T>C) en la posición 153076789 localizada en el intrón 4 del gen *VIP*.

15 Se entiende por polimorfismo rs12201140 a la sustitución A>T (en la hebra complementaria la sustitución sería T>A) en la posición 153076956 localizada en el intrón 4 del gen *VIP*.

20 Se entiende por polimorfismo rs74760293 a la sustitución T>C (en la hebra complementaria la sustitución sería A>G) en la posición 153077241 localizada en el intrón 4 del gen *VIP*.

Se entiende por polimorfismo rs149081483 a la sustitución T>G (en la hebra complementaria la sustitución sería A>C) en la posición 153078500 localizada en el intrón 6 del gen *VIP*.

25 Una realización aún más preferida del primer aspecto de la invención se refiere al método donde la enfermedad autoinmune es preferiblemente artritis autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, espondiloartritis o lupus eritematoso sistémico. En una realización aún más preferida la artritis autoinmune es artritis de reciente comienzo o artritis reumatoide.

30 Se entiende por "enfermedad autoinmune" en la presente invención aquella enfermedad en la que las células del sistema inmune desencadenan una respuesta inflamatoria crónica en uno o varios tejidos del individuo provocando su deterioro o incluso destrucción. En la presente invención los términos "enfermedad autoinmune" y
35 EIMMI se utilizan indistintamente.

En la presente invención el término “artritis autoinmune” englobaría tanto los términos “Artritis Reumatoide” como “Artritis Indiferenciada” tanto si es de reciente comienzo como si está bien establecida.

5

Se entiende por “Artritis de Reciente Comienzo” (ARC) (o artritis de inicio) en la presente invención, aquella enfermedad consistente en inflamación de al menos una articulación, de menos de un año de evolución que cumple los criterios preestablecidos por el Colegio Americano de Reumatología (*American College of Rheumatology* o ACR) y EULAR de “Artritis reumatoide o AR” (Aletaha, Neogi *et al.* Ann Rheum Dis 2010;69:1580-1588) o, que sin cumplir dichos criterios, no cumple criterios de otras enfermedades autoinmunes, degenerativas o metabólicas que puedan explicar los síntomas. Este último caso, viene siendo denominado “Artritis Indiferenciada” (AI) que, en muchos de los casos, dejados a su libre evolución, acaban desembocando en una AR. La definición de Artritis Indiferenciada está ganando progresivamente aceptación entre los expertos en la materia, ya que se entiende que cuanto más precozmente se trate a los pacientes más opciones de inducir remisión tenemos y en la actualidad se acepta establecer tratamiento inmunomodulador en pacientes que no cumplen criterios de AR. En esta invención los términos ARC, AR o AI hacen referencia a una enfermedad sistémica autoinmune crónica y progresiva, la cual provoca la inflamación crónica fundamentalmente de las articulaciones, y que dada su naturaleza progresiva, produce la destrucción de las mismas, con su consecuente deformación y pérdida de capacidad funcional. Además, esta enfermedad puede provocar alteraciones extraarticulares en diversos órganos. La actividad de la enfermedad se puede determinar mediante índices compuestos que proporcionan un número que aglutina la información de diferentes variables clínicas y analíticas como el DAS28 (Prevoo *et al.* Arthritis Rheum 1995;38:44-48), SDAI, CDAI (Smolen *et al.* Rheumatology (Oxford) 2003;42:244-257) y otros.

Se entiende por “espondiloartritis” en la presente invención como aquellas enfermedades autoinmunes con afectación axial y/o periférica que cumplen los criterios de clasificación de la *Assessment of SpondyloArthritis International Society* (ASAS o Sociedad Internacional de Evaluación de Espodiloartritis) (Rudwaleit *et al.* Ann Rheum Dis 2011;70:25-31).

35

Se entiende por “lupus eritematoso sistémico” en la presente invención aquella enfermedad autoinmune sistémica definida por los criterios del Colegio Americano de Reumatología (Tan *et al.* *Arthritis Rheum*·1982;25:1271-1277).

5 El término “enfermedad inflamatoria intestinal” o “EII” en la presente invención se refiere a la inflamación crónica del intestino en un individuo, donde dicha inflamación es debida al sistema inmune del propio individuo. Las dos formas más frecuentes corresponden a la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. Por lo que en una realización preferida la enfermedad autoinmune es colitis ulcerosa o enfermedad de
10 Crohn.

En la presente invención se entiende por “psoriasis” aquella enfermedad cutánea la cual está caracterizada por un mal funcionamiento del sistema inmune, lo que provoca un exceso de producción de células cutáneas. Esta enfermedad da lugar a la
15 formación de abultamientos rojizos cubiertos de descamaciones. Además, el exceso de producción de células también produce la infiltración de glóbulos blancos en la piel. Las lesiones de forma general se localizan en regiones con un mayor rozamiento, como por ejemplo, aunque sin limitarse, los codos, las rodillas o ingles.

20 Otra realización aún más preferida del primer aspecto de la invención se refiere al método donde la muestra biológica es sangre, suero, plasma, saliva, orina, líquido sinovial o linfa.

Otra realización aún más preferida del primer aspecto de la invención se refiere al
25 método donde el sujeto es un humano.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el pronóstico de una enfermedad autoinmune en un sujeto que padece una enfermedad autoinmune, que comprende:

- 30 a. la detección de los polimorfismos genéticos del gen *VIP* rs35643203, rs71575932 y/o rs7755568 en una muestra biológica ;
- b. la asociación del alelo T del polimorfismo genético rs35643203, la asociación del alelo G del polimorfismo genético rs71575932 y/o la asociación del alelo A del polimorfismo rs7755568, a un mal pronóstico.

35

En adelante nos referiremos a éste como al “método segundo de la invención”.

El término “*in vitro*” se refiere a que el método de la invención se realiza fuera del cuerpo del sujeto.

5

Una realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al método que además comprende en el paso (a) la detección del polimorfismo rs3823082 y/o la detección del polimorfismo rs688136 del gen VIP; y en el paso (b) la asociación del genotipo TT del polimorfismo rs3823082 con un mal pronóstico y/o la asociación del genotipo CC del polimorfismo rs688136 con un buen pronóstico.

10

Otra realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al método *in vitro* que además comprende la detección en el paso (a) de al menos uno de los polimorfismos genéticos del gen *VIP* que se selecciona de la lista que comprende rs12213214, rs60946248, rs140023105, rs7764067, rs12201030, rs74760293, rs149081483 y rs12201140; o cualquiera de sus combinaciones, y la asociación en el paso (b) del alelo A del polimorfismo rs12213214, del alelo T del polimorfismo rs60946248, del alelo G del polimorfismo rs140023105, del alelo T del polimorfismo rs7764067, , del alelo C del polimorfismo rs74760293, del alelo G del polimorfismo rs149081483 y del alelo T del polimorfismo rs12201140, o cualquiera de sus combinaciones, a un mal pronóstico y/o la asociación del alelo G del polimorfismo rs12201030 a un buen pronóstico.

15

20

Una realización más preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al método *in vitro* donde la enfermedad autoinmune es artritis autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, espondiloartritis o lupus eritematoso sistémico. En una realización aún más preferida la artritis autoinmune es artritis de reciente comienzo o artritis reumatoide. En otra realización preferida, la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

25

30

Una realización aún más preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al método *in vitro* donde la muestra biológica es sangre, suero, plasma, saliva, orina, líquido sinovial o linfa.

Otra realización aún más preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al método donde el sujeto es un humano.

5 Los métodos de la invención permiten disponer de información útil para la toma de decisiones terapéuticas, permitiendo seleccionar a los pacientes con mayor probabilidad de necesitar un tratamiento intenso. Esto deriva en un abaratamiento de los costes directos e indirectos de la enfermedad y una mejora de la calidad de vida del paciente.

10 La presente invención también se refiere a un método según el método segundo de la invención donde tras el paso (b) si el sujeto presenta un mal pronóstico, se trata al sujeto con una terapia combinada de FAME sintéticos o de un FAME sintético y uno biológico, especialmente si la terapia biológica es un agente bloqueante del factor de necrosis tumoral (TNF). Por ejemplo pero sin limitarse el agente bloqueantes del TNF
15 es adalimumab, certolizumab, etanercept, golimumab o infliximab. Entre los FAME sintéticos se pueden encontrar azatioprina, antipalúdicos, metotrexato, leflunomida, sulfasalacina y/o ciclosporina A. Por el contrario, si el sujeto presenta un buen pronóstico tras el paso (b), se trata a dicho sujeto con una monoterapia de FAME no biológico.

20 Un tercer aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para diseñar un tratamiento individualizado para un sujeto que padece una enfermedad autoinmune que comprende detectar los polimorfismos genéticos del gen *VIP* rs35643203, rs71575932 y/o rs7755568 en una muestra biológica; en el que la presencia del alelo
25 T del polimorfismo genético rs35643203, la presencia del alelo G del polimorfismo genético rs71575932 o la presencia del alelo A del polimorfismo genético rs7755568 es indicativa de que el tratamiento a administrar es una terapia combinada de FAME sintético y biológico. En adelante nos referiremos a éste como al “método tercero de la invención”.

30 Se entiende por “tratamiento” al conjunto de medios que se emplean para curar o aliviar una enfermedad. En la presente invención el tratamiento a administrar es una terapia combinada de FAME, donde los fármacos son al menos uno sintético y al menos uno biológico cuando el sujeto presenta un mal pronóstico. Preferiblemente el
35 fármaco biológico es un agente bloqueante del factor de necrosis tumoral (TNF), por

ejemplo pero sin limitarse el agente bloqueantes del TNF es adalimumab, certolizumab, etanercept, golimumab o infliximab. Entre los FAME sintéticos (también denominado no-biológicos) se pueden encontrar azatioprina, antipalúdicos, metotrexato, leflunomida, sulfasalacina y/o ciclosporina A. Por el contrario, si el sujeto
5 presenta un buen pronóstico, se trata a dicho sujeto con una monoterapia de FAME no biológico.

Una realización preferida del tercer aspecto de la invención se refiere al método *in vitro* que además comprende la detección el polimorfismo rs3823082 y/o del rs688136
10 y donde la presencia del genotipo TT del polimorfismo rs3823082 de dicho polimorfismo es indicativa de que el tratamiento a administrar es dicha terapia combinada y/o donde la presencia del genotipo CC del polimorfismo rs688136 es indicativa de que el tratamiento a administrar sea monoterapia de FAME sintético.

Una realización más preferida del tercer aspecto de la invención se refiere al método *in vitro* que además comprende la detección del polimorfismo del gen *VIP* que se selecciona de la lista que comprende rs12213214, rs60946248, rs140023105, rs7764067, rs12201030, rs12201140, rs74760293, rs149081483 y rs12201140; o cualquiera de sus combinaciones; y donde la presencia del alelo A del polimorfismo
20 rs12213214, del alelo T del polimorfismo rs60946248, del alelo G del polimorfismo rs140023105, del alelo T del polimorfismo rs7764067, del alelo A del polimorfismo rs7755568, del alelo C del polimorfismo rs74760293 y del alelo G del polimorfismo rs149081483 cualquiera de sus combinaciones, es indicativa de que el tratamiento a administrar es dicha terapia combinada y donde la presencia del alelo T del
25 rs12201030 es indicativa de que el tratamiento a administrar sea monoterapia de FAME sintético.

Una realización aún más preferida del tercer aspecto de la invención se refiere al método *in vitro* donde la enfermedad autoinmune es artritis autoinmune, enfermedad
30 inflamatoria intestinal, psoriasis, espondiloartritis o lupus eritematoso sistémico. En una realización aún más preferida, la artritis autoinmune es artritis de reciente comienzo o artritis reumatoide. En otra realización preferida, la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

Otra realización aún más preferida del tercer aspecto de la invención se refiere al método *in vitro* donde la muestra biológica es sangre, suero, plasma, saliva, orina, líquido sinovial o linfa.

5 La detección de los polimorfismos de la invención puede realizarse mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia, por ejemplo por secuenciación, por genotipado, por amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (RCP), por “restriction fragment length polymorphism” (RFLP) o mediante enzimas de restricción. La detección puede realizarse mediante el empleo de cebadores o sondas.

10

El término “secuenciación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la determinación de los nucleótidos de un ácido nucleico molde y de su orden.

15

Las condiciones en las cuáles se realiza la secuenciación generalmente incluyen (a) poner en contacto un ácido nucleico molde con una polimerasa en una mezcla que además comprende un cebador, un catión bivalente (por ejemplo, Mg^{2+}), y nucleótidos, generalmente, dNTPs y al menos, un ddNTP (dideoxinucleótido trifostato), y (b) someter dicha mezcla a una temperatura suficiente para que la polimerasa inicie la incorporación de los nucleótidos al cebador mediante complementariedad de bases con el ácido nucleico molde, y de lugar a una población de moléculas de ADN complementario de diferente tamaño. La separación de dicha población de moléculas de ADN complementario, generalmente, mediante electroforesis, permite determinar la secuencia de nucleótidos.

20

25

El término “amplificación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al aumento del número de copias de un ácido nucleico molde.

30

Las condiciones en las cuáles se realiza la amplificación generalmente incluyen (a) poner en contacto un ácido nucleico molde con una polimerasa en una mezcla que además comprende al menos un cebador (siendo normalmente dos cebadores), un catión bivalente (por ejemplo, Mg^{2+}), y nucleótidos, generalmente, dNTPs (b) someter dicha mezcla a una temperatura suficiente para que la polimerasa inicie la incorporación de los nucleótidos al cebador mediante complementariedad de bases con el ácido nucleico molde, y de lugar a una población de moléculas de ADN complementario generalmente del mismo tamaño.

35

La RCP también puede ser RCP cuantitativa en tiempo real.

5 El término “ácido nucleico molde” o “molde”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una molécula de ácido nucleico de cadena simple o de doble cadena que va a ser amplificada o secuenciada.

10 El término “cebador” (también denominado “primer” u “oligo”), como se utiliza aquí, se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN cuando hibrida con el ácido nucleico molde. Preferiblemente, el cebador es un oligonucleótido de desoxirribosa. Los cebadores pueden prepararse mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse a, la clonación y restricción de secuencias apropiadas y la síntesis química directa. Los cebadores pueden diseñarse para hibridar con secuencias específicas de nucleótidos en el ácido nucleico molde (cebadores específicos) o pueden ser sintetizados al azar (cebadores arbitrarios).

20 De acuerdo con la presente invención un “cebador” puede ser marcado o etiquetado mediante técnicas bien conocidas en el estado de la técnica. Etiquetas detectables incluyen, por ejemplo, isótopos radiactivos, etiquetas fluorescentes, etiquetas quimioluminiscentes, etiquetas bioluminiscentes o etiquetas enzimáticas.

25 En una realización preferida, los cebadores (primers) son los descritos como SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, o cualquiera de sus combinaciones. Además, los primers pueden estar modificados para comprender secuencias que sean de utilidad en la técnica utilizada, por ejemplo en secuenciación. Por ejemplo, los primers pueden comprender la secuencia SEQ ID NO: 60 unida a su extremo 5' en el caso del primer sentido, y la secuencia SEQ ID NO: 61 unida al extremo 5' del primer antisentido.

35 Los métodos de la invención pueden ser aplicados a lo largo de cualquier momento del desarrollo de la enfermedad autoinmune. También los métodos de la invención se pueden aplicar en pacientes sin tratamiento con fármacos inmunomoduladores.

Los métodos de la invención pueden comprender además la cuantificación de al menos un producto de expresión del gen *VIP* en una muestra biológica aislada y/o también la cuantificación de variables clínicas. Estas variables clínicas pueden ser por ejemplo, aunque sin limitarse el sexo del paciente, el estado de actividad al inicio de la enfermedad, así como otras conocidas por el experto en la materia. En caso de estarse estudiando la artritis de reciente comienzo o artritis reumatoide, podrían ser los anticuerpos antipeptidos citrulinados (ACPA). Por lo que una realización particular del primer, del segundo y del tercer aspecto de la invención se refiere a los métodos donde además se detectan ACPA. La detección de los ACPA puede realizarse por las técnicas conocidas por el experto en la materia, como por ejemplo ELISA.

Cualquiera de los pasos de los métodos de la invención pueden ser total o parcialmente automatizados. Además de los pasos especificados anteriormente, los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender otros pasos adicionales, por ejemplo, relacionados con el pre-tratamiento de la muestra o con la extracción del material genético necesario para su posterior análisis.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso del polimorfismo genético del gen *VIP* rs35643203, rs71575932 y/o rs7755568 como marcador pronóstico de enfermedad autoinmune en un sujeto que padece una enfermedad autoinmune.

Una realización preferida del cuarto aspecto de la invención se refiere al uso que además comprende el uso del polimorfismo genético del gen *VIP* rs3823082 y/o rs688136.

Una realización más preferida del cuarto aspecto de la invención se refiere al uso que además comprende el uso de los polimorfismos genéticos del gen *VIP* seleccionados de la lista que comprende: rs12213214, rs60946248, rs140023105, rs7764067, rs12201030, rs74760293, rs149081483 y rs122001140, o cualquiera de sus combinaciones.

Una realización aún más preferida del cuarto aspecto de la invención se refiere al uso donde la enfermedad autoinmune es artritis autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, espondiloartritis o lupus eritematoso sistémico. En una realización aún más preferida la artritis autoinmune es artritis de reciente comienzo o artritis

reumatoide. En otra realización preferida, la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

5 Un quinto aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende primers o sondas para detectar los polimorfismos genéticos del gen *VIP* rs35643203, rs71575932 y/o rs7755568.

10 Una realización preferida del quinto aspecto de la invención se refiere al kit que además comprende primers o sondas para detectar el polimorfismo genéticos del gen *VIP* rs3823082 y/o rs688136.

15 Una realización más preferida del quinto aspecto de la invención se refiere al kit que además comprende primers o sondas que detectan los polimorfismos genéticos del gen *VIP* rs12213214, rs60946248, rs140023105, rs7764067, rs12201030, rs74760293, rs149081483 y rs12201140, o cualquiera de sus combinaciones.

20 Otra realización aún más preferida del quinto aspecto de la invención se refiere al kit que además comprende los elementos necesarios para detectar ACPA, por ejemplo, primers, sondas, anticuerpos específicos, péptidos citrulinados o proteínas citrulinadas.

25 En una realización preferida, el kit comprende los primers descritos como SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, o cualquiera de sus combinaciones. Además, los primers pueden estar modificados para comprender secuencias que sean de utilidad en la técnica utilizada, por ejemplo en secuenciación. Por ejemplo, los primers pueden comprender la secuencia SEQ ID NO: 60 unida a su extremo 5' en el caso del primer sentido, y la secuencia SEQ ID NO: 61 unida al extremo 5' del primer antisentido.

30 El kit de la invención además puede comprender al menos una ADN polimerasa, una retrotranscriptasa, una ARN polimerasa o un fluoróforo. Además el kit puede comprender una mezcla de deoxinucleótidos tri-fosfato (dNTPs), una mezcla de nucleótidos tri-fosfato (NTPs), deoxirribonucleasa (DNasa), inhibidores de la ribonucleasa (RNasa), Dithiothreitol (DTT), pirofosfatasa inorgánica (PPI) y los

35

tampones necesarios para las enzimas proporcionadas en el kit. Los kits pueden contener además otras moléculas, genes, proteínas o sondas de interés, que sirvan como controles positivos y negativos. Preferiblemente, los kits comprenden además las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.

5

En la presente invención la sonda o los cebadores pueden estar situados en un soporte sólido, por ejemplo, pero sin limitarse, cristal, plástico, tubos, placas multipocillo, membranas, o cualquier otro soporte conocido.

10

Un sexto aspecto de la invención se refiere al uso del kit del quinto aspecto de la invención para el pronóstico de una enfermedad autoinmune en un sujeto que padece dicha enfermedad.

15

Una realización preferida del sexto aspecto de la invención se refiere al uso donde la enfermedad autoinmune es artritis autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, espondiloartritis o lupus eritematoso sistémico. En una realización aún más preferida la artritis autoinmune es artritis autoinmune de reciente comienzo o artritis reumatoide. En otra realización preferida, la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

20

Por la presente invención se deduce que ésta también se refiere a los métodos de la invención cuando los polimorfismos que se detectan son los relativos a los alelos mayores y que están descritos en la presente invención. Lo mismo sucede en el caso del uso de dichos polimorfismos del cuarto aspecto de la invención, del kit del quinto aspecto de la invención y del uso del kit del sexto aspecto de la invención.

25

Los términos "polinucleótido", "secuencia nucleotídica", "secuencia de nucleótidos", "ácido nucleico" y "oligonucleótido" se usan en la presente invención de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, que pueden estar, o no, química o bioquímicamente modificados.

30

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la

35

invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

FIG. 1 representa los niveles de VIP en suero de pacientes con artritis de inicio según el genotipo de los polimorfismos rs35643203 (panel A), rs71575932 (panel B) y rs7755568 (panel C).

10

FIG. 2 representa los niveles de VIP según el genotipo del polimorfismo rs3823082 en suero en pacientes con AR.

FIG. 3 representa los niveles de VIP según el genotipo del polimorfismo rs688136 (panel A) y rs12201140 (panel B) en suero en pacientes con AR.

15

FIG. 4 representa los niveles de VIP en suero de pacientes con AR según la combinación de genotipos de rs3823082, rs35643203, rs71575932 y rs7755568. *En el eje de abscisas, la etiqueta 0 corresponde a no ser homocigoto T de rs3823082 y no tener ningún alelo menor de rs35643203, rs71575932 o rs7755568. La etiqueta 1
20 corresponde a ser homocigoto T de rs3823082 o tener, al menos, un alelo menor de rs35643203, de rs71575932 o de rs7755568. La etiqueta 2 corresponde a ser homocigoto T de rs3823082 y tener, al menos, un alelo menor de rs35643203, de rs71575932 o de rs7755568.

25

FIG. 5 representa como interfieren entre si la presencia de genotipos asociados a bajos niveles de VIP con el genotipo CC de rs688136 que se asocia a niveles más altos de VIP. *En el eje de abscisas, la etiqueta 0 corresponde a no ser homocigoto T de rs3823082 y no tener ningún alelo menor de rs35643203, rs71575932 o rs7755568. La etiqueta 1
30 corresponde a ser homocigoto T de rs3823082 o tener, al menos, un alelo menor de rs35643203, de rs71575932 o de rs7755568. La etiqueta 2 corresponde a ser homocigoto T de rs3823082 y tener, al menos, un alelo menor de rs35643203, de rs71575932 o de rs7755568.

35

FIG. 6 representa niveles de actividad (estimada con el índice del Hospital Universitario de la Princesa [HUPI]; Castrejón *et al*, Arthritis Care Res 2013; 65: 518-

25) a lo largo del seguimiento según la combinación de genotipos de rs3823082, rs35643203, rs71575932 y rs7755568 que se asocian a tener VIP bajo en suero de pacientes con AR. *En el eje de abscisas, la etiqueta 0 corresponde a no ser homocigoto T de rs3823082 y no tener ningún alelo menor de rs35643203, de rs71575932 o de rs7755568. La etiqueta 1 corresponde a ser homocigoto T de rs3823082 o tener, al menos, un alelo menor de rs35643203, de rs71575932 o de rs7755568. La etiqueta 2 corresponde a ser homocigoto T de rs3823082 y tener, al menos, un alelo menor de rs35643203, de rs71575932 o de rs7755568.

10 **FIG. 7** representa la intensidad de tratamiento después de dos años de seguimiento (calculada como el número de días con FAME en los dos años de seguimiento/ número de días entre visita basal y final; para una definición más extensa ver Gonzalez-Alvaro PLoS One 2011; 6: e29492) según la combinación de genotipos de rs3823082, rs35643203, rs71575932 y rs7755568 que se asocian a tener VIP bajo en suero de pacientes con AR. *En el eje de abscisas, la etiqueta 0 corresponde a no ser homocigoto T de rs3823082 y no tener ningún alelo menor de rs35643203, de rs71575932 o de rs7755568. La etiqueta 1 corresponde a ser homocigoto T de rs3823082 o tener, al menos, un alelo menor de rs35643203, de rs71575932 o de rs7755568. La etiqueta 2 corresponde a ser homocigoto T de rs3823082 y tener, al menos, un alelo menor de rs35643203, de rs71575932 o de rs7755568.

25 **FIG. 8** representa la intensidad de tratamiento después de dos años de seguimiento (calculada como el número de días con FAME en los dos años de seguimiento/ número de días entre visita basal y final; para una definición más extensa ver Gonzalez-Alvaro PLoS One 2011; 6: e29492) según la combinación de genotipos de rs3823082, rs35643203, rs71575932 y rs7755568 que se asocian a tener VIP bajo en suero estratificado por género (A), diagnóstico (B) y resultado del test de anticuerpos anti-proteínas citrulinadas (ACPA; C) en pacientes con AR. *En el eje de abscisas, la etiqueta 0 corresponde a no ser homocigoto T de rs3823082 y no tener ningún alelo menor de rs35643203, rs71575932 o rs7755568. La etiqueta 1 corresponde a ser homocigoto T de rs3823082 o tener, al menos, un alelo menor de rs35643203, de rs71575932 o de rs7755568. La etiqueta 2 corresponde a ser homocigoto T de rs3823082 y tener, al menos, un alelo menor de rs35643203, de rs71575932 o rs7755568.

35

FIG. 9 representa la progresión radiológica después de dos años de seguimiento según los pacientes tengan o no alguno de los genotipos de rs3823082, de rs35643203, de rs71575932 o de rs7755568 que se asocian a tener VIP bajo en suero en pacientes con AR.

5

FIG. 10 representa la progresión radiológica después de dos años de seguimiento según los pacientes tengan o no alguno de los genotipos de rs3823082, de rs35643203, de rs71575932 o de rs7755568 que se asocian a tener VIP bajo en suero en pacientes con AR, estratificada por número de copias del epítipo compartido (A) o del hábito tabáquico (B).

10

FIG. 11 representa como interfiere la presencia de genotipos asociados a bajos niveles de VIP en pacientes con artritis reumatoide (ser homocigoto TT de rs3823082 o tener, al menos, un alelo menor de rs35643203, de rs7157932 o de rs7755568) con tener un alelo C de rs688136 en los niveles de VIP sérico de pacientes del registro de espondiloartritis de inicio.

15

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la utilidad de los métodos de la invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

20

25

Ejemplo 1: estudio descriptivo de variantes genéticas de VIP que se relacionan con sus niveles séricos en artritis reumatoide

Se procedió a secuenciar el gen *VIP* y sorprendentemente se encontró que determinadas variantes genéticas del mismo correlacionaban con niveles séricos bajos del péptido VIP en suero y se demostró que determinados genotipos aparecían en los pacientes con peor pronóstico (es decir, peor curso evolutivo o mayor gravedad) y necesidad de un tratamiento más intenso.

35

Se llevaron a cabo dos tipos de estudios: en el primero se seleccionaron 10 pacientes con niveles bajos de VIP en suero y 15 pacientes con niveles altos de VIP en suero para secuenciar el gen completo de VIP y detectar las diferencias existentes entre los dos grupos; en el segundo estudio se validaron las variantes genéticas detectadas en el primer estudio en la población completa de artritis de inicio del Hospital Universitario (HU) de La Princesa (342 pacientes con, al menos, dos años de seguimiento).

Población: para este estudio, de entre 91 pacientes, en los que se determinaron los niveles de VIP a lo largo de su seguimiento en el estudio, se seleccionaron 10 pacientes cuyos niveles de VIP a lo largo del seguimiento se encontraban por debajo del percentil 25 de la población control (100 donantes de sangre sanos procedentes del Centro Nacional de Transfusiones de Madrid). De ellos, 5 pacientes tenían niveles de VIP por debajo del percentil 10. Por otra parte, se seleccionaron 15 pacientes con niveles de VIP por encima del percentil 90 de la población control. Se obtuvo DNA de estos 25 pacientes y se secuenció el gen de VIP desde -1933 pares de bases (pb o bp) antes del inicio de transcripción hasta 2651 pb después del fin del último exón.

Para llevar a cabo la secuenciación se dividió el gen en 29 segmentos (amplicones) solapantes. Para la mayor parte de los amplicones se utilizaron las secuencias de primers descritas por Applied Biosystems® y accesibles a través del NCBI

```

(">gnl|Probe|1357097b.1  RSA  probe  RSA001033793,  PCR  primer  (42  bp);
>gnl|Probe|1357097c.1  RSA  probe  RSA001033793,  PCR  primer  (44  bp);
>gnl|Probe|1357099b.1  RSA  probe  RSA001033798,  PCR  primer  (38  bp);
>gnl|Probe|1357100b.1  RSA  probe  RSA001033801,  PCR  primer  (38  bp);
25  >gnl|Probe|1357101b.1  RSA  probe  RSA001033803,  PCR  primer  (38  bp);
>gnl|Probe|1361007c.1  RSA  probe  RSA000585838,  PCR  primer  (38  bp);
>gnl|Probe|1357100c.1  RSA  probe  RSA001033801,  PCR  primer  (39  bp);
>gnl|Probe|1357101c.1  RSA  probe  RSA001033803,  PCR  primer  (44  bp);
>gnl|Probe|1357102b.1  RSA  probe  RSA001033807,  PCR  primer  (38  bp);
30  >gnl|Probe|1357103b.1  RSA  probe  RSA001033810,  PCR  primer  (44  bp);
>gnl|Probe|1357103c.1  RSA  probe  RSA001033810,  PCR  primer  (42  bp);
>gnl|Probe|1357317c.1  RSA  probe  RSA001031301,  PCR  primer  (42  bp);
>gnl|Probe|1357318b.1  RSA  probe  RSA001031306,  PCR  primer  (43  bp);
>gnl|Probe|1357318c.1  RSA  probe  RSA001031306,  PCR  primer  (44  bp);

```

>gnl|Probe|1356759b.1 RSA probe RSA001046167, PCR primer (37 bp);
 >gnl|Probe|1357310b.1 RSA probe RSA001031315, PCR primer (44 bp);
 >gnl|Probe|1356759c.1 RSA probe RSA001046167, PCR primer (38 bp);
 >gnl|Probe|1357311b.1 RSA probe RSA001031320, PCR primer (42 bp);
 5 >gnl|Probe|1357313b.1 RSA probe RSA001031334, PCR primer (44 bp);
 >gnl|Probe|1356753c.1 RSA probe RSA001046172, PCR primer (38 bp)”, referidos a

las secuencias SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 14, 21, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 44, 57 y 59). No obstante, hubo que diseñar nuevos primers específicos para cubrir las áreas no descritas (principalmente en intrones) e incluso
 10 dividir algunos de los amplicones descritos debido a que su tamaño era demasiado grande (SEQ ID NO: 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 28, 31, 34, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58). La lista de *primers* (sentido, “*forward*” y antisentido, “*reverse*”) para los diferentes amplicones que se utilizaron se muestra en las secuencias SEQ ID NO: 2 a 59. Para evitar errores en la
 15 secuenciación, también se utilizaron los primers en donde en su extremo 5’ se añadió la secuencia TGTAACGACGGCCAGT en los primers sentido (SEQ ID NO: 60) y la secuencia CAGGAAACAGCTATGACC en los primers antisentido (SEQ ID NO: 61), donde dichas secuencias se refieren a una secuencia añadida del virus M13 que se utilizó para verificar la correcta secuenciación. La secuenciación se llevó a cabo en un
 20 analizador genético de electroforesis capilar con 8 capilares de Applied Biosystems® (3500 Genetic Analyzer) que permite ejecutar la resecuenciación del gen en busca de perfiles mutacionales utilizando un solo polímero en la matriz capilar.

Se consiguieron datos de alta calidad de secuenciación en 9 pacientes con VIP bajo y
 25 11 pacientes con VIP alto. Los principales datos clínicos de estos pacientes según su nivel de expresión de VIP (alto o bajo) se muestran en la tabla 1. Una vez obtenidas las secuencias de los 29 amplicones para cada uno de los 20 pacientes, se compararon con la secuencia consenso de VIP publicada en PubMed con la referencia NC_000006.11 (Cromosoma 6; 153071932-153080900) mediante el
 30 *software Variant Reporter* (Applied Biosystems®). En este proceso, se detectaron 17 polimorfismos de nucleótido único (SNP), 15 descritos previamente y 2 nuevos, respecto a la secuencia consenso de VIP. La tabla 2 describe de forma más detallada las variantes genéticas detectadas en los 20 pacientes con su distribución según niveles séricos de VIP.

Tabla 1. Datos clínicos de los pacientes en los que se realizó la secuenciación de VIP, según los niveles séricos de este neuropéptido.

	VIP alto (n=11)	VIP bajo (n=9)	Total (n=20)	P
Género femenino	8 (73%)	5 (56%)	13 (65%)	0,37
Edad (med [p25, p75])	58 [49 – 69]	46 [41 – 54]	54 [46 – 64]	0,04
Diagnóstico				
Artritis Reumatoide	7 (64%)	7 (78%)	14 (70%)	0,43
Artritis Indiferenciada	4 (36%)	2 (22%)	6 (30%)	
Factor Reumatoide +	3 (27%)	4 (44%)	7 (35%)	0,37
ACPA +	1 (9%)	5 (56%)	6 (30%)	0,05
Fumador	4 (40%)	4 (50%)	8 (45%)	0,80
DAS28 basal (med [p25, p75])	5,7 [4,4 – 6,8]	4,6 [4,4 – 4,8]	4,8 [4,4 – 6,4]	0,19
HUPI basal (med [p25, p75])	9,5 [7 – 11,5]	7 [6,5 – 8]	8 [6,5 – 11,5]	0,41.

5 ACPA: anticuerpos anti-proteínas citrulinadas; DAS28: *disease activity score* para recuentos de 28 articulaciones; HUPI: Índice de actividad del HU de la Princesa (Castrejon *et al.* Arthritis Care Res 2013, 65(4):518-25); med: mediana; p25: percentil 25; p75: percentil 75; se consideró significativo $p \leq 0,05$.

10 Como se observa en la tabla 2, de las 17 variantes tipo SNP, cuatro mostraron diferencias casi significativas entre los dos grupos de pacientes (VIP alto y VIP bajo): rs35643203, rs3823082, rs71575932 y rs7755568.

15 rs35643203: se trata de una sustitución C>T (en la hebra complementaria la sustitución sería G>A) en la posición 153072433 localizada en el intrón 1 del gen VIP. La frecuencia del alelo menor (MAF) T en la población general es del 3% y en la presente invención se encontró un MAF del 17% en los pacientes con VIP bajo y del 0% en los pacientes con VIP alto. Esta posición se secuenció correctamente en los 20 pacientes y, además, pudo ser confirmada ya que se encontraba cubierta por los amplicones 4 y 5.

20 rs3823082: se trata de una sustitución C>T (en la hebra complementaria la sustitución sería G>A) en la posición 153074322 localizada en el intrón 2. La frecuencia del alelo

menor T descrita en población general es del 25%. En la presente invención se encontró una MAF del 28% en los pacientes con VIP bajo y del 4% en los pacientes con VIP alto. Esta posición se secuenció correctamente en los 20 pacientes, estando localizada en el amplicón 9.

5

rs71575932: se trata de una sustitución A>G (en la hebra complementaria la sustitución sería T>C) en la posición 153075844 localizada en el intrón 3. La frecuencia del alelo menor G descrita en población general es del 3%. En la presente invención se encontró una MAF del 17% en los pacientes con VIP bajo y del 0% en los

10 pacientes con VIP alto. Esta posición se secuenció correctamente en los 20 pacientes, con confirmación por estar representada en los amplicones 14 y 15.

10

rs7755568: se trata de una sustitución T>A (en la hebra complementaria la sustitución sería A>T) en la posición 153076955 localizada en el intrón 4. La frecuencia del alelo menor A descrita en población general es del 8%. En la presente invención se encontró una MAF del 22% en los pacientes con VIP bajo y del 0% en los pacientes con VIP alto. Esta posición se secuenció correctamente en los 20 pacientes, estando localizada en el amplicón 17.

15

20

Tabla 2. Variantes genéticas detectadas en pacientes con artritis de reciente comienzo según su expresión de VIP.

Cluster report	Posición según NC_000006.11:g	Posición según NM_003381.3:c	Región	MAF	VIP alto	VIP bajo	p
rs12213214	153070786C>A	-1319C>A	Promotor	0,223	1 CA (9%)	2 CA (22%)	0,421
rs60946248	153071195C>T	-910C>T	Promotor	0,025	0 (0%)	1 CT (11%)	0,45
rs140023105	153072056A>G	-49A>G	5' UTR Exón 1	0,009	0 (0%)	1 AG (11%)	0,474
rs35643203	153072433C>T	-11+339C>T	Intrón 1	0,033	0 (0%)	3 CT (33%)	0,074
rs3799142	153072696T>C	-11+602T>C	Intrón 1	0,17	1 TC (9%)	1 TC (11%)	0,711
rs7764067	153074199A>T	107+780A>T	Intrón 2	0,209	1 AT (9%)	2 AT (22%)	0,421
rs3823082	153074322C>T	107+903C>T	Intrón 2	0,255	1 CT (9%)	3 CT (33%) 1 TT (11%)	0,166
Nuevo	153074732A>G		Intrón 2	¿?	0 AG (0%)	1 AG (11%)	0,45
rs12201173	153075076T>C	108-225T>C	Intrón 2	0,155	1 TC (9%)	1 TC (11%)	0,711
rs71575932	153075844A>G	230+421A>G	Intrón 3	0,034	0 AG (0%)	3 AG (33%)	0,074
rs12201030	153076789A>G	335+281A>G	Intrón 4	0,089	2 AG (18%)	1 AG (11%)	0,579
rs7755568	153076955T>A	336-314T>A	Intrón 4	0,080	0 TA (0%)	2 TA (22%) 1 AA (11%)	0,074
rs12201140	153076956A>T	336-313A>T	Intrón 4	0,142	0 AT (0%)	1 AT (11%)	0,45
rs74760293	153077241T>C	336-28T>C	Intrón 4	0,042	0 TC (0%)	1 TC (11%)	0,45
rs149081483	153078500T>G	*43+181T>G	Intrón 6	<0,01	0 TG (0%)	1 TG (12%)	0,471
Nuevo	153078574C>A		Intrón 6	¿?	1 CA (11%)	0 CA (0%)	0,529
rs688136	153080061T>C	*60T>C	UTR 3' Exón 7	0,357	2 TC (18%) 2 CC (18%)	4 TC (44%)	0,448

“¿?” se refiere a que al ser de nueva descripción, se desconoce su MAF en población general.

Ejemplo 2: validación de los polimorfismos de único nucleótido de VIP rs3823082, rs7755568, rs35643203, rs71575932 y rs688136

De las 17 variantes genéticas descritas respecto a la secuencia consenso (Tabla 2), en un primer paso se decidió estudiar aquellos SNPs que mostraron una distribución diferencial entre pacientes con niveles de VIP bajo y pacientes con VIP alto con una tendencia a la significación estadística. Dado el bajo número de pacientes estudiados, se consideró que una $p < 0,2$ podría ser una forma de priorizar el estudio de las variantes genéticas. Además se ha estudiado el SNP rs688136 por ser el único cuya variante menor aparecía más representada en pacientes con VIP alto. Para el estudio de validación se han utilizado 457 pacientes del registro de artritis de reciente comienzo del HU de La Princesa con muestras de DNA disponibles (datos clínicos completos en Tabla 3). En el caso de los SNPs rs3823082, rs35643203, rs71575932 y rs688136, se procedió al genotipado mediante sondas TaqMan® de Applied Biosystems® (números de catálogo: C__27491244_10, C__3250637_10, C__3250638_10 y C__3250639_10 respectivamente de la referencia TaqMan Genotyping Assays 4351379). En el caso del SNP rs7755568, el genotipado se ha llevado a cabo mediante secuenciación del amplicón 17 según se ha descrito previamente. Esto nos ha permitido tener información de otras dos variantes genéticas también presentes en dicho amplicón: rs12201030 y rs12201140.

Tabla 3. Datos clínicos de los pacientes en los que se realizó la validación de los datos obtenidos en el ejemplo 1).

	Total (n=457)	Con VIP en suero (n=87)	Con seguimiento de 2 años (n=307)
Género femenino	365 (80%)	63 (72%)	240 (78%)
Edad (med [p25, p75])	54 [42 – 66]	54 [44 -66]	54 [43 – 66]
Diagnóstico			
Artritis Reumatoide	276 (60%)	66 (77%)	216 (70%)
Artritis Indiferenciada	169 (37%)	21 (23%)	91 (30%)
Otros	12 (3%)		
Factor Reumatoide +	201 (44%)	38 (44%)	152 (49,5%)
ACPA +	182 (40%)	42 (48%)	142 (46%)
Fumador	193 (44%)	40 (46%)	122 (42%)

	Total (n=457)	Con VIP en suero (n=87)	Con seguimiento de 2 años (n=307)
DAS28 basal (med [p25, p75])	4,3 [3,3 – 5,5]	4,9 [3,6 – 6]	4,5 [3,5 – 5,7]
HUPI basal (med [p25, p75])	6,5 [4 – 9,5]	8 [6 -10]	7 [4,5 – 10]

ACPA: anticuerpos anti proteínas citrulinadas; DAS28: *disease activity score* para recuentos de 28 articulaciones; HUPI: índice de actividad del HU de La Princesa (Castrejon *et al.* Arthritis Care Res 2013, 65(4):518-25); med: mediana; p25: percentil 25; p75: percentil 75.

5

Como control de calidad, el genotipo obtenido por secuenciación para los SNPs rs3823082, rs35643203, rs71575932 y rs688136 en los 20 pacientes del ejemplo 1) ha sido confirmado mediante genotipado por RCP cuantitativa y sondas TaqMan. Globalmente se ha obtenido el genotipo de los 2 primeros SNPs en 440 pacientes del registro, en 428 pacientes en el caso de rs71575932 y en 425 pacientes para rs688136. La MAF (*minor allele frequency*, en este caso el alelo T) de rs3823082 es de 23,2%. La MAF (alelo T) de rs35643203 es de 6,5%. La MAF de rs71575932 (alelo G) es de 7,5%. LA MAF (alelo C) de rs688136 es de 34%.

10

15

En el caso de rs7755568 no se ha podido genotipar este SNP mediante sondas TaqMan puesto que se encuentra en una región con predominio de las bases A y T, resultando imposible conseguir primers suficientemente específicos. Por este motivo, se decidió realizar mediante secuenciación del amplicón 17, lo cual nos ha permitido conocer también el genotipo de rs12201030 y rs12201140. Se ha conseguido el genotipo de 293, 301 y 291 pacientes respectivamente. La MAF (alelo A) de rs7755568 es de 6,8%. La MAF (alelo G) de rs12201030 es de 10,6%. Y la MAF (alelo T) de rs12201140 es de 12,9%.

20

25

Como se observa en las siguientes tablas de expresión, algunas de estas 7 variantes genéticas tienen una asociación significativa que casi alcanza el desequilibrio de unión perfecto entre rs35643203, rs71575932 y rs7755568. A pesar de que estas tres variantes genéticas se encuentran en intrones distintos (1, 3 y 4), como se observa en las tablas 4, 5 y 6, sus alelos se distribuyeron de forma prácticamente idéntica. Por lo

que se puede concluir que los SNPs rs35643203, rs71575932 y rs7755568 están en desequilibrio de ligamiento.

Tabla 4. Asociación entre los SNPs rs71575932 y rs35643203

		rs71575932			Total
		AA	AG	GG	
rs35643203	CC	360 100%	7 11,86%	0 0%	267 87,17%
	CT	0 0%	52 88,14%	0 0%	52 12,35%
	TT	0 0%	0 0%	2 100%	2 0,48%
Total		360 100%	52 100%	2 100%	421 100%

5 Test exacto de Fisher < 0,001

Tabla 5. Asociación entre los SNPs rs35643203 y rs7755568.

		rs35643203			Total
		CC	CT	TT	
rs7755568	TT	250 97,28%	2 6,45%	0 0%	252 86,90%
	TA	7 2,72%	29 93,55%	0 0%	36 12,41%
	AA	0 0%	0 0%	2 100%	2 0,69%
Total		257 100%	31 100%	2 100%	290 100%

Test exacto de Fisher <0,001

10

15

Tabla 6. Asociación entre los SNPs rs71575932 y rs7755568

		rs71575932			Total
		AA	AG	GG	
rs7755568	TT	242 97,58%	7 19,44%	0 0%	249 87,06%
	TA	6 2,42%	29 80,56%	0 0%	35 12,24%
	AA	0 0%	0 0%	2 100%	2 0,48%
Total		248 100%	36 100%	2 100%	286 100%

Test exacto de Fisher <0,001

5 Para demostrar que la asociación no es tan perfecta con los otros SNP (rs3823082, rs688136, rs12201030 y rs12201140) se ha elegido a rs35643203 como representante de los 3 anteriores. Incluso con algunos de ellos la asociación no es significativa.

Tabla 7. Asociación entre los SNPs rs35643203 y rs3823082.

		rs35643203			Total
		CC	CT	TT	
rs3823082	CC	258 69,35%	0 0%	0 0%	258 60,56%
	CT	99 26,61%	41 78,85%	0 0%	140 32,86%
	TT	15 4,03%	11 21,15%	2 100%	28 6,57%
Total		372 100%	52 100%	2 100%	426 100%

Test exacto de Fisher <0,001

10

15

Tabla 8. Asociación entre los SNPs rs35643203 y rs688136.

		rs35643203			Total
		CC	CT	TT	
rs688136	TT	170 46,70%	7 13,73%	0 0%	177 42,45%
	TC	162 44,51%	31 60,78%	0 0%	193 46,28%
	CC	32 8,79%	13 25,49%	2 100%	47 11,27%
Total		364 100%	51 100%	2 100%	417 100%

Test exacto de Fisher = 0,000

Tabla 9. Asociación entre los SNPs rs35643203 y rs12201030.

		rs35643203			Total
		CC	CT	TT	
rs12201030	AA	205 77,95%	28 84,85%	2 100%	235 78,86%
	AG	57 21,67%	5 15,15%	0 0%	62 20,81%
	GG	1 0,38%	0 0%	0 0%	1 0,34%
Total		263 100%	33 100%	2 100%	426 100%

5

Test exacto de Fisher = 0,723

Tabla 10. Asociación entre los SNPs rs35643203 y rs12201140.

		rs35643203			Total
		CC	CT	TT	
rs12201140	AA	190 73,93%	24 82,76%	2 100%	216 75,00%
	AT	64 24,90%	5 17,24%	0 0%	69 23,96%
	TT	3 1,17%	0 0%	0 0%	3 1,04%

Total	257 100%	29 100%	2 100%	288 100%
-------	-------------	------------	-----------	-------------

Test exacto de Fisher = 0,794

5 Tampoco existe relación relevante entre rs3823082, rs688136, rs12201030 y 12201140. (Datos no mostrados)

Ejemplo 2.1: Relación entre el genotipo de las diferentes variantes y los niveles de VIP en la población ampliada de artritis de reciente comienzo.

10 Como se muestra en la Figura 1, los pacientes homocigotos del alelo común de rs35643203 (panel A, genotipo CC), presentaron niveles significativamente mayores de VIP en suero que los pacientes portadores de, al menos, un alelo T. Como rs35643203 se encuentra en desequilibrio de unión con rs71575932 y rs7755568, el patrón de niveles de VIP sérico entre sus genotipos es prácticamente idéntico
15 (paneles B y C respectivamente). Las diferencias en los niveles de significación corresponden a diferencias en el número de muestras por falta de información sobre el genotipo de algunos pacientes por fallo de la técnica. Como se puede apreciar en los tres casos, entre los pacientes homocigotos del alelo mayor, aunque los niveles de VIP son en general mayores, siguen existiendo pacientes con niveles bajos de VIP.
20 Esto implica que estas variantes genéticas no son las únicas implicadas en la regulación de los niveles del neuropéptido.

En lo que respecta al SNP rs3823082, como se aprecia en la figura 2, son los pacientes homocigotos del alelo menor (T) los que presentan menores niveles de VIP.
25 Como se ha mencionado al describir la figura previa, también en el caso de este SNP existen pacientes con niveles bajos entre los que presentan, al menos una copia del alelo común (C).

En la figura 3 se muestran los niveles de VIP según los genotipos de los SNPs
30 rs688136 (panel A) y rs12201140 (panel B). En el estudio de secuenciación el alelo menor de rs688136 se encontró con mayor frecuencia entre los pacientes con VIP alto, especialmente el genotipo CC. En la población total en la que disponemos de niveles séricos de VIP, se observa esta tendencia, aunque sin alcanzar niveles significativos (figura 3A). Esta situación parece estar relacionada con la interacción

con rs12201140. En el caso de este SNP, el alelo menor (T) solo se encontró en alguno de los pacientes con VIP bajo, como genotipo heterocigoto. En la población más amplia con niveles séricos de VIP se observa esa tendencia a que sean menores en los heterocigotos AT, pero se pierde esa tendencia en los homocigotos TT. La explicación es que estos cuatro pacientes homocigotos TT de rs12201140, que deberían tener niveles más bajos que los heterocigotos AT, son todos homocigotos CC de rs688136 que se asocia a niveles más elevados. Esto sugiere que las diferentes variantes encontradas interaccionan entre ellas, por lo que se precisan estudios estadísticos más complejos que se describen más adelante.

5

10

Respecto a rs12201030, la información de la que disponemos sugiere que no influye en los niveles séricos de VIP (datos no mostrados).

15

El estudio de las interacciones entre las diferentes variantes genéticas, se inició analizando si existía efecto aditivo entre las variantes claramente asociadas a VIP bajo: tener al menos un alelo menor de rs35643203, rs71575932 o rs7755568 (en desequilibrio de unión) y ser homocigoto del alelo menor de rs3823082. Como muestra la figura 4, cuantas más variantes genéticas asociadas a VIP bajo, menores son los niveles de VIP, aumentando la significación estadística.

20

En la figura 5 se muestra como ser homocigoto CC de rs688136 modula hacia niveles mayores de VIP el efecto descrito en la figura 4.

25

En resumen, al menos 5 de las 17 variantes genéticas tipo SNP detectadas en el ejemplo 1) se asocian con distribución diferencial en los niveles de VIP. Por lo que podrían ser utilizadas como biomarcadores pronósticos en vez de la medición de los niveles de VIP. Los genotipos que individualmente aportan más información son rs35643203, rs71575932 y rs7755568 que podrían ser intercambiables, ya que su distribución es prácticamente idéntica (Tablas 4 a 6). Por su parte, rs3823082 aporta información adicional sobre una subpoblación de pacientes, homocigotos de su alelo menor, que también contribuye a que se tengan niveles séricos menores de VIP. El efecto aditivo de estos cuatro SNPs se ve claramente en la figura 4. Por último, el genotipo CC de rs688136 se asocia a tener niveles séricos de VIP más elevados.

30

La interacción entre estas variantes genéticas se ve más claramente en el análisis multivariable mostrado en la tabla 11, en la que se han incluido también las variables edad y uso de agentes bloqueantes del TNF que en un estudio previo habíamos demostrado que se asociaban significativamente a aumento de los niveles de VIP (Martínez C *et al.* 2014 PLOS One 1:e85248). En el modelo sin interacción entre rs35643203 (como representación de los tres SNPs que están en desequilibrio de unión: rs35643203, rs71575932 y rs7755568) y rs3823082 se observa que en el caso del primer SNP resultan coeficientes negativos (indican asociación a niveles más bajos de VIP) en forma dosis dependiente a la presencia del alelo menor T que alcanza la significación estadística en los casos heterocigotos (por tener un mayor tamaño muestral). En el caso de rs3823082 los coeficientes también son negativos aunque no se alcanza significación estadística. Cuando se realiza el modelo con interacción se observa un efecto aditivo entre los dos alelos menores de rs35643203 y rs3823082. En ambos modelos, el genotipo CC de rs688136 presenta coeficientes positivos y altamente significativos.

Tabla 11. Efecto de diferentes variantes genéticas en el gen de VIP sobre sus niveles séricos, ajustado por edad y uso de medicación bloqueante de TNF.

	Modelo sin interacción*		Modelo con interacción**	
	Coef. $\beta \pm$ e.s.	P	Coef. $\beta \pm$ e.s.	P
Edad	2,6 \pm 1,1	0,016	2,5 \pm 1,1	0,019
Uso de terapia anti-TNF	136 \pm 57	0,017	128 \pm 57	0,026
rs35643203 / rs3823082				
CC / CC			Referencia	-
CC / CT			-40 \pm 46	0,388
CC / TT			128 \pm 138	0,353
CT / CC			No datos	-
CT / CT			-117 \pm 64	0,066
CT / TT			-310 \pm 98	0,002
TT / CC			No datos	-
TT / CT			No datos	-
TT / TT			-363 \pm 174	0,037
rs35643203				
CC	Referencia	-		

	CT	-131 ± 66	0,046		
	TT	-239 ± 181	0,187		
rs3823082	CC	Referencia	-		
	CT	-25 ± 46	0,58		
	TT	-75 ± 94	0,424		
Genotipo rs688136	TT	Referencia	-	Referencia	-
	TC	51 ± 34	0,133	44 ± 34	0,185
	CC	211 ± 74	0,004	235 ± 74	0,002

Coef: coeficiente; e.s.: error estándar. Se considera estadísticamente significativo $p < 0,05$. *El modelo sin interacción estudia el efecto de los genotipos de rs35643203 y de rs3823082 por separado. **El modelo con interacción estudia el efecto de las diferentes combinaciones de genotipos rs35643203 y rs3823082. Por este motivo hay 5 celdas vacías en la tabla.

Ejemplo 2.2: Estudio de las variantes genéticas rs3823082, rs35643203 y rs71575932 como marcadores pronósticos en pacientes con artritis de inicio.

10 Para analizar si las mencionadas variantes genéticas o su combinación eran de utilidad para predecir el pronóstico de los pacientes con artritis de inicio se utilizaron tres parámetros relacionados con la gravedad de la enfermedad:

- actividad de la enfermedad estimada mediante los índices compuestos DAS28 (el “gold standard” en la actualidad) y HUPI, un índice para la evaluación de la enfermedad recientemente descrito (Castrejon *et al.* Arthritis Care Res 2013;65:518-25) que tiene menos sesgos que el DAS28.
- requerimiento de tratamiento en los dos primeros años de seguimiento. Dado que no es éticamente aceptable estudiar la historia natural de la enfermedad sin intervención (tratamiento con FAME) que nos proporcionaría el escenario ideal e irrefutable para el estudio de factores pronósticos, se considera aceptable usar variables de requerimientos de tratamiento como variables subrogadas de la actividad de la enfermedad o gravedad. En este sentido, se ha utilizado la intensidad de tratamiento con FAME que se calcula como la suma del número de días que el paciente ha estado con los diferentes FAME que haya recibido en los dos primeros años de seguimiento, ponderados por

un coeficiente según la potencia del FAME, partido por el número de días transcurridos entre la visita basal y la de dos años de seguimiento (para una definición más exacta ver Gonzalez-Alvaro *et al.* PLoS One 2011; 6(12):e29492)

- 5 - la progresión radiológica en los dos primeros años de seguimiento medida según el índice de Sharp modificado por van der Heijde (disponible sólo en 91 pacientes), conocido por el experto en la materia.

10 En lo que se refiere a la actividad de la enfermedad a lo largo del seguimiento, no se observaron diferencias entre los genotipos de los SNP de forma individualizada con ninguno de los dos índices de actividad utilizados (datos no mostrados). Cuando se agruparon los pacientes según el número de variantes genéticas asociadas a VIP sérico bajo (teniendo en cuenta los 4 SNPs según se ha descrito en la figura 4), se observó una tendencia, no significativa, a presentar un mayor nivel de actividad en los
15 pacientes portadores de las variantes relacionadas con menores niveles de VIP (Figura 6), es decir, ser homocigoto T de rs3823082 y tener, al menos, una copia del alelo menor de rs35643203, de rs71575932 o de rs7755568.

20 Estas diferencias fueron más marcadas en las visitas 2 y 3, aunque en ningún caso se alcanzó significación estadística (en el mejor de los casos, visita 3, la $p=0,113$). Lógicamente, a lo largo del seguimiento, en aquellos pacientes en los que se observó persistencia de la actividad de la enfermedad se fue intensificando el tratamiento y, por ello, en la visita final prácticamente no se observaron diferencias entre los 3 grupos de pacientes.

25 Por este motivo, se realizó un análisis multivariante en el que se estudió el efecto de los genotipos de variantes genéticas de VIP sobre la evolución de la actividad enfermedad, ajustado por otras variables ya descritas que inciden sobre la actividad de la enfermedad (género, edad, tratamiento, presencia de ACPA). Como se observa
30 en la tabla 12, tener una edad mayor de 45 años se asocia a valores más elevados de los índices que evalúan la actividad de la enfermedad (DAS28 de proteína C reactiva, [PCR] o HUPI) y ser mujer se asocia a tener valores más elevados de DAS28 de PCR. Lógicamente, el uso de los diferentes FAME y la terapia anti-TNF se asociaron a disminución de la actividad de la enfermedad. Ajustando por estas variables, tener 2
35 variantes genéticas asociadas a niveles séricos bajos de VIP se asoció, de forma

significativa, a tener niveles más elevados de actividad de la enfermedad en pacientes con ACPA negativos. En el caso de rs688136, tener genotipo CC mostró una tendencia, no significativa, a tener menor actividad de la enfermedad.

5 Tabla 12. Análisis multivariable del efecto de las variantes genéticas de VIP sobre la evolución de la actividad en pacientes con artritis de inicio.

	DAS28		HUPI	
	Coef. $\beta \pm e.s.$	p	Coef. $\beta \pm e.s.$	p
Sexo				
Masculino	Referencia	-	Referencia	-
Femenino	0,32±0,15	0,037	0,48±0,34	0,162
Edad				
<45 años	Referencia	Referencia	Referencia	-
45-65 años	0,35±0,15	0,021	0,87±0,34	0,01
>65 años	0,26±0,17	0,129	0,64±0,38	0,94
Metotrexato	-0,81±0,08	<0,001	-1,80±0,19	<0,001
Leflunomida	-0,66±0,11	<0,001	-1,54±0,26	<0,001
Antipalúdicos	-0,50±0,12	<0,001	-1,35± 0,29	<0,001
Sulfasalcina	-0,45±0,19	0,019	-1,12±0,45	0,01
Sales de oro	-1,88±0,49	<0,001	-3,13±1,05	0,003
Anti-TNF	-0,92±0,19	<0,001	-2,60±0,45	<0,001
ACPA/Genotipos VIP bajo*				
Negativo / 0	Referencia	-	Referencia	-
Negativo / 1	0,18±0,26	0,482	0,01±0,60	0,984
Negativo / 2	0,94±0,50	0,058	2,02±1,13	0,075
Positivo / 0	0,24±0,14	0,087	0,52±0,32	0,106
Positivo / 1	0,11±0,25	0,656	0,42±0,57	0,462
Positivo / 2	0,06±0,60	0,912	0,51±1,39	0,715
rs688136				
TT	Referencia	-	Referencia	-
TC	0,13±0,13	0,323	0,25±0,31	0,414
CC	-0,24±0,22	0,291	-0,71±0,52	0,172

* la etiqueta 0 corresponde a no ser homocigoto T de rs3823082 y no tener ningún alelo menor de rs35643203, de rs71575932 o de rs7755568. La etiqueta 1 corresponde a ser homocigoto T de rs3823082 o tener, al menos, un alelo menor de

rs35643203, de rs71575932 o de rs7755568. La etiqueta 2 corresponde a ser homocigoto T de rs3823082 y tener, al menos, un alelo menor de rs35643203, de rs71575932 o de rs7755568.

5 La siguiente variable a analizar fue la intensidad del tratamiento con FAME a lo largo de los dos años de seguimiento. Esta variable puede ser considerada una variable subrogada de gravedad, ya que, como se ha mencionado en el párrafo anterior, aquellos pacientes que en el seguimiento tienen peor evolución van siendo tratados de forma más intensa.

10

Como ocurrió con la actividad de la enfermedad, el genotipo de los SNP aislados no proporcionó información sólida (datos no mostrados). En la figura 7 se muestran los requerimientos de tratamiento según las combinaciones de los genotipos de rs3823082, rs35643203, rs71575932 y rs7755568 que se asocian a tener VIP bajo. De nuevo, se observa que los pacientes que tienen la asociación de genotipos para VIP bajo, precisan un tratamiento más intenso, de forma más homogénea. En un análisis simple estas diferencias no alcanzan significación estadística ($p=0,3$). Por estudio previos de la comunidad reumatológica está bien establecido que la presencia de ACPA (anticuerpos anti proteínas citrulinadas) o el género femenino son factores de mal pronóstico. Este conocimiento produce un sesgo de intervención, es decir, hace que los médicos responsables prescriban un tratamiento intensivo precoz cuando están presentes cualquiera de los factores y, por ello, en el análisis de la relación entre variantes genéticas de VIP e intensidad de tratamiento, ACPA y género femenino actúan como factores de confusión o modificadores.

15

20

Por este motivo, se realizó un análisis multivariable que confirmó que las mujeres, los pacientes que cumplían criterios de AR y, de forma casi significativa, los que presentaban ACPA, recibieron una mayor intensidad de tratamiento (Tabla 13). Ajustando por estas variables de confusión, comprobamos que los pacientes que presentaban las variantes genéticas asociadas a tener niveles bajos de VIP (es decir ser homocigoto T de rs3823082 y tener, al menos, una copia del alelo menor de rs35643203, de rs71575932 o de rs7755568) recibieron un tratamiento significativamente más intenso (Tabla 13 y Figura 8).

25

30

Tabla 13. Variables asociadas a la prescripción de un tratamiento más intenso con FAME en pacientes con artritis de reciente comienzo.

	Coefficiente	Error estándar	p
Género			
Masculino	Referencia	-	-
Femenino	0,36	0,12	0,003
Diagnóstico			
Artritis Indiferenciada	Referencia	-	<0,001
Artritis Reumatoide	0,85	0,12	
ACPA			
Negativo	Referencia	-	0,072
Positivo	0,20	0,11	
Variantes genéticas asociadas a VIP sérico bajo			
Ninguna	Referencia	-	-
Una	-0,14	0,15	0,344
Dos	0,77	0,35	0,028
rs688136			
TT	Referencia	-	-
TC	0,01	0,11	0,929
CC	-0,14	0,19	0,441

La condición de cada variable considerada referencia por el modelo es aquella frente a la que se comparan las otras condiciones de dicha variable. Por ejemplo, ajustado por el efecto del resto de variables, ser mujer se asocia a recibir 0,36 veces más el tratamiento que reciben los hombres.

La figura 8 permite visualizar como las variables género, diagnóstico y ACPA están introduciendo un sesgo o confundiendo/modificando el efecto de nuestra variable de interés (niveles de VIP bajos o normales) en la variable dependiente (o de desenlace), en este caso la intensidad de tratamiento con FAME. Así vemos que la mayor intensidad de tratamiento asociada a presentar las variantes genéticas que determinan tener VIP bajo (ser homocigoto T de rs3823082 y tener, al menos, una copia del alelo menor de rs35643203, de rs71575932 o de rs7755568) se ve mejor en el caso de pacientes varones, con artritis indiferenciada o ACPA negativo que no incitan al reumatólogo a un tratamiento más intenso desde el comienzo del cuadro.

En los pacientes que cumplen criterios de AR, son mujeres o tienen ACPA positivos, los médicos responsables tienden a tratar siempre de forma más intensa, aunque también se ve una cierta tendencia a mayor tratamiento en los que tienen más variantes genéticas asociadas a VIP bajo (etiqueta 2).

5

En lo que se refiere a uso de terapia combinada, aquellos pacientes que tenían más alelos asociados a VIP bajo en suero recibieron este tipo de tratamiento con mayor frecuencia (62,5%) que los que no tenían ningún alelo asociado a VIP bajo (46,03%). Las diferencias no alcanzaron significación estadística, probablemente porque, en aras de conseguir un control más rápido de la enfermedad, el uso de terapia combinada es una práctica muy frecuente entre los reumatólogos del HU La Princesa.

10

Por último, en una población más limitada, se estudió cómo afecta la presencia de las variantes genéticas en la destrucción articular medida con el índice de Sharp modificado por van der Heijde (Van der Heide DM *et al.* J Rheumatol 1995;22(9):1792-6). Como se aprecia en la figura 9, los pacientes que no tenían variantes genéticas asociadas a VIP sérico bajo tuvieron una menor progresión radiológica en conjunto que los que tenían, al menos, una variante genética. Estas diferencias casi alcanzaron la significación estadística ($p=0,062$). De nuevo, se realizó un análisis multivariante en el que se incluyeron variables que se sabe afectan a la progresión radiológica como la presencia del epítipo compartido, ser fumador o el sexo.

15

20

Tabla 14. Variables asociadas a la progresión de la destrucción articular en pacientes con artritis de reciente comienzo estimada en radiografías de manos y pies mediante el índice de Sharp con la modificación de van der Heijde.

25

	Coficiente	Error estándar	P
Género			
Masculino	Referencia	-	-
Femenino	-9	3,9	0,020
Hábito tabáquico			
No fumador	Referencia	-	-
Ex-fumador	-8,7	6,7	0,196
Fumador	10,5	4,2	0,013
Número de copias de EC			

Ninguna	Referencia	-	-
Una	4,2	3,5	0,231
Dos	13,8	5,7	0,016
Variantes genéticas asociadas a VIP sérico bajo			
No	Referencia	-	
Si	13,1	4,9	0,007
rs688136			
TT			
TC	N.I.	N.I.	-
CC			

E.C.: epítipo compartido (se refiere a la secuencia de aminoácidos común que codifican aquellos alelos de HLA-DRB1 que se asocian a mayor riesgo para desarrollar artritis reumatoide). N.I. no incluido por no mejorar el modelo.

5 Ejemplo 3: Relación entre el genotipo de las diferentes variantes y los niveles de VIP en una población de espondiloartritis de reciente comienzo

Para determinar si los hallazgos descritos previamente son extensibles a otras enfermedades mediadas por mecanismos inmunes, se estudiaron 54 pacientes de nuestra consulta de espondiloartritis de inicio en los que se determinaron los niveles de VIP en suero, así como aquellas variantes genéticas que en la población de artritis de inicio influían en los niveles de VIP (rs3823082, rs71575932, rs35643203, rs688136). En este estudio no se genotipó rs7755568 porque está en desequilibrio de unión con rs71575932 y rs35643203.

15

Los datos clínicos de los pacientes se describen en la Tabla 15.

Tabla 15. Características basales de los pacientes de la consulta de espondiloartritis de inicio según su diagnóstico final.

	Espondiloartritis (n=36)	Lumbalgia crónica (n=18)	Total (n=54)	p
Edad (años)	36,1 ± 10,7	40,1 ± 10,1	37,5 ± 10,6	N.S.
Género femenino (%)	24 (66,7)	9 (50,0)	33 (61,1)	N.S.
Historia familiar de SpA (%)	14 (38,9)	1 (5,6)	15 (27,8)	0,042
HLA-B27 positivo (%)	21 (58,3)	3 (16,7)	24 (44,4)	0,012
Entesitis	15 (41,7)	4 (22,2)	19 (35,2)	N.S.
Artritis periférica	11 (30,6)	1 (5,6)	12 (22,2)	N.S.
Uveitis	3 (8,3)	1 (5,6)	4 (7,4)	N.S.
Psoriasis	4 (11,1)	1 (5,6)	5 (9,3)	N.S.
EII **	2 (5,6)	0 (0,0)	2 (3,7)	N.S.
Sacroiliitis RM **	21 (58,8)	2 (11,1)	23 (42,6)	0,004
Sacroiliitis X-ray**	12 (33,3)	0 (0,0)	12 (22,2)	N.S.
BASDAI*	41,2 ± 22,9	35,6 ± 22,4	39,4 ± 22,7	N.S.
BASFI***	29,0 ± 34,5	24,0 ± 33,0	25,5 ± 34,0	N.S.
PCR (mg/dl) *	0,3 ± 1,0	0,1 ± 0,2	0,2 ± 0,7	N.S.
ESR (mm/h)*	16,5 ± 19,5	11,5 ± 13,0	14,0 ± 17,0	N.S.
Hb (g/dl)*	13,2 ± 2,5	14,5 ± 1,3	13,7 ± 2,2	0,025
VIP (pg/ml) *	250,4 ± 75,2	271,5 ± 111,9	250,7 ± 91,7	N.S.

EII, Enfermedad Inflamatoria Intestinal; **RM** Resonancia Magnética; **BASDAI**, "Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index"; **BASFI**, "Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index"; **PCR**: proteína C reactiva; **VSG**, velocidad de sedimentación globular; **Hb**, hemoglobina; **VIP**, "vasoactive intestinal peptide"; **N.S.** no significativo.

En esta nueva población, confirmamos que, al igual que ocurría en la población de artritis de inicio, rs71575932 y rs35643203 se encuentran en desequilibrio de ligamiento ya que su genotipo es prácticamente idéntico en todos los pacientes (Tabla 16).

Tabla 16. Asociación entre los SNPs rs71575932 y rs35643203 en pacientes con espondiloartritis de inicio

		rs71575932			Total
		AA	AG	GG	
rs35643203	CC	45 100%	1 33%	0 0%	46 93,88%
	CT	0 0%	2 66,67%	0 0%	2 4,08%
	TT	0 0%	0 0%	1 100%	1 2,04%
Total		45 100%	3 100%	1 100%	49 100%

Test exacto de Fisher < 0,001

5

Por lo tanto, se puede concluir que ambos polimorfismos pueden ser utilizados indistintamente. Esta situación fue diferente con rs3823082 y rs688136, como se observa en las tablas 17 y 18 respectivamente. Como ocurrió con los pacientes de artritis de inicio, rs3823082 presentó una distribución similar a rs71575932 y rs35643203, pero con una subpoblación relevante no coincidente en sus genotipos (Tabla 17).

10

Tabla 17. Distribución comparativa de los genotipos de los SNPs rs71575932 y rs3823082 en pacientes con espondiloartritis de inicio

		rs71575932			Total
		AA	AG	GG	
rs3823082	CC	33 71,74%	1 25%	0 0%	34 66,67%
	CT	11 23,91%	2 50%	0 0%	13 25,49%
	TT	2 4,35%	1 25%	1 100%	4 7,84%
Total		46 100%	4 100%	1 100%	51 100%

Test exacto de Fisher = 0,013

15

Las diferencias en los genotipos de rs71575932 o rs35643203 y rs688136 fue aún más dispar (Tabla 18), igual que ocurría en el ejemplo 1 en pacientes con artritis de inicio.

5

Tabla 18 Distribución comparativa de los genotipos de los SNPs rs71575932 y rs3823082 en pacientes con espondiloartritis de inicio

		rs71575932			Total
		AA	AG	GG	
rs688136	TT	23 50%	0 0%	0 0%	34 66,67%
	TC	14 30,43%	3 75%	0 0%	13 25,49%
	CC	9 19,57%	1 25%	1 100%	4 7,84%
Total		46 100%	4 100%	1 100%	51 100%

Test exacto de Fisher = 0,042

10 Para determinar cómo influyen las variantes genéticas de VIP estudiadas en los niveles séricos de este neuropéptido de los pacientes con espondiloartritis de inicio, se llevó a cabo un análisis multivariable ajustado de forma similar al que se ha mostrado en el ejemplo 2.1 (Tabla 11) para pacientes con artritis de inicio. Los resultados obtenidos son similares en ambos casos, con la salvedad de que los valores de significación p son menores en el análisis de pacientes con espondiloartritis ya que el tamaño muestral fue mucho menor. La tabla 19 muestra que tener algún alelo menor de los SNPs asociados a VIP bajo en artritis de inicio (rs3823082, rs71575932, rs35643203), también se asoció a menores niveles séricos de VIP en espondiloartritis de inicio. Por el contrario, ser portador de, al menos, un alelo menor C de rs688136 se asoció con niveles séricos de VIP más elevados (Tabla 19). La única diferencia es que en el caso de los pacientes con espondiloartritis la edad no mostró asociación a los niveles séricos de VIP, probablemente porque los pacientes con espondiloartritis suelen debutar a una edad homogéneamente más joven que los de artritis reumatoide, en los que hay una mayor variabilidad y el espectro de edades es más amplio como para detectar la pequeña asociación que se describe en la Tabla 11.

15

20

25

La figura 11 muestra de forma gráfica cómo ser portador del alelo menor de rs688136, en ausencia de algún alelo menor de rs3823082, rs71575932 o rs35643203, se asocia con la presencia de niveles más altos de VIP (caja blanca a la izquierda de la figura). Por el contrario, tener algún alelo menor de rs3823082, rs71575932 o rs35643203, en ausencia del alelo menor de rs688136, hace que los niveles de VIP sean más bajos (caja gris oscura a la derecha de la figura). También se observa cómo interaccionan entre ellos, de forma que presente la presencia del alelo menor de rs688136 compensa el efecto de tener algún alelo menor de rs3823082, rs71575932 o rs35643203 y los niveles en este caso son intermedios y similares a que no hubiese ningún alelo menor de estas cuatro variantes (cajas centrales de la figura).

Tabla 19. Efecto de diferentes variantes genéticas en el gen de VIP sobre sus niveles séricos (normalizados mediante transformación logarítmica), ajustado por uso de medicación bloqueante de TNF.

	Coeficiente β .	Error estándar	p
Uso de terapia anti-TNF	0,13	0,07	0,045
Al menos un alelo menor de rs3823082, rs71575932 o rs35643203	Ausente	Referencia	-
	Presente	-0,12	0,1
Genotipo rs688136	TT	Referencia	-
	TC o CC	0,17	0,1

Coef: coeficiente; e.s.: error estándar. Se considera estadísticamente significativo $p < 0,05$

Ejemplo 4: Relación entre el genotipo de las diferentes variantes y los niveles de VIP en una población de lupus eritematoso sistémico

Para determinar si los hallazgos descritos previamente eran extensibles a lupus eritematoso sistémico, se realizó un estudio con 78 sueros de pacientes de dicha enfermedad. Como conclusión, se observan datos similares a los referidos para la artritis reumatoide y para espondiloartritis.

REIVINDICACIONES

1. Método de obtención de datos útiles para el pronóstico de una enfermedad autoinmune que comprende la detección de los polimorfismos genéticos del gen “péptido intestinal vasoactivo” (*VIP*) rs35643203, rs71575932 y/o rs7755568 en una muestra biológica aislada de un sujeto que padece una enfermedad autoinmune.
5
2. Método según la reivindicación 1 que además comprende la detección del polimorfismo genético rs3823082 y/o rs688136 del gen *VIP*.
10
3. Método según la reivindicación 2 que además comprende la detección de al menos uno de los polimorfismos genéticos del gen *VIP* que se selecciona de la lista que comprende: rs12213214, rs60946248, rs140023105, rs7764067, rs12201030, rs74760293, rs149081483 y rs12201140; o cualquiera de sus combinaciones.
15
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la enfermedad autoinmune se selecciona de la lista que comprende: artritis autoinmune, espondiloartritis, lupus eritematoso sistémico, psoriasis y enfermedad inflamatoria intestinal.
20
5. Método según la reivindicación 4 donde la artritis autoinmune es artritis reumatoide.
25
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde la muestra biológica es sangre, suero, plasma, saliva, orina, líquido sinovial o linfa.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde el sujeto es un humano.
30
8. Método *in vitro* para el pronóstico de una enfermedad autoinmune en un sujeto que padece una enfermedad autoinmune, que comprende:
 - a. la detección de los polimorfismos genéticos del gen *VIP* rs35643203, rs71575932 y/o rs7755568 en una muestra biológica ; y
35

- b. la asociación del alelo T del polimorfismo genético rs35643203, la asociación del alelo G del polimorfismo genético rs71575932 y/o la asociación del alelo A del polimorfismo rs7755568, a un mal pronóstico.
- 5 9. Método según la reivindicación 8 que además comprende en el paso (a) la detección del polimorfismo rs3823082 y/o rs688136 del gen *VIP* y en el paso (b) la asociación del genotipo TT del polimorfismo rs3823082 con un mal pronóstico y/o la asociación del genotipo CC del polimorfismo rs688136 con un buen pronóstico.
- 10 10. Método según la reivindicación 9 que además comprende la detección en el paso (a) de al menos uno de los polimorfismos genéticos del gen *VIP* que se selecciona de la lista que comprende rs12213214, rs60946248, rs140023105, rs7764067, rs12201030, rs74760293, rs149081483 y rs12201140; o cualquiera de sus combinaciones, y la asociación en el paso (b) del alelo A del polimorfismo rs12213214, del alelo T del polimorfismo rs60946248, del alelo G del polimorfismo rs140023105, del alelo T del polimorfismo rs7764067, del alelo G del polimorfismo rs12201030, del alelo C del polimorfismo rs74760293, del alelo G del polimorfismo rs149081483 y del alelo T del polimorfismo rs12201140, o cualquiera de sus combinaciones, a un mal pronóstico.
- 15
- 20 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 donde además en un paso (c) se detectan anticuerpos antiproteínas citrulinadas.
- 25 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 donde la enfermedad autoinmune se selecciona de la lista que comprende: artritis autoinmune, espondiloartritis, lupus eritematoso sistémico, psoriasis y enfermedad inflamatoria intestinal.
- 30 13. Método según la reivindicación 12 donde la artritis autoinmune es artritis reumatoide.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 donde la muestra biológica es sangre, plasma, suero, saliva, orina, líquido sinovial o linfa.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14 donde el sujeto es un humano.
- 5 16. Método *in vitro* para diseñar un tratamiento individualizado para un sujeto que padece una enfermedad autoinmune que comprende detectar los polimorfismos genéticos del gen *VIP* rs35643203, rs71575932 y/o rs7755568 en la muestra biológica; en el que la presencia del alelo T del polimorfismo genético rs35643203, la presencia del alelo G del polimorfismo genético rs71575932 y/o la presencia del alelo A del polimorfismo rs7755568 es indicativa de que el tratamiento a 10 administrar es una terapia combinada de fármacos modificadores de la enfermedad (FAME) sintético y biológico.
- 15 17. Método según la reivindicación 16 que además comprende la detección del polimorfismo del gen *VIP* rs3823082 y/o rs688136 y donde la presencia del genotipo TT del polimorfismo rs3823082 es indicativa de que el tratamiento a administrar es dicha terapia combinada y/o la presencia del genotipo CC del polimorfismo rs688136 es indicativa de que el tratamiento a administrar es monoterapia de FAME no biológico.
- 20 18. Método según la reivindicación 17 que además comprende la detección del polimorfismo del gen *VIP* que se selecciona de la lista que comprende rs12213214, rs60946248, rs140023105, rs7764067, rs12201030, rs74760293, rs149081483 y rs12201140; o cualquiera de sus combinaciones; y donde la presencia del alelo A del polimorfismo rs12213214, del alelo T del polimorfismo 25 rs60946248, del alelo G del polimorfismo rs140023105, del alelo T del polimorfismo rs7764067, del alelo A del polimorfismo rs7755568, del alelo C del polimorfismo rs74760293, del alelo G del polimorfismo rs149081483 y del alelo T del polimorfismo rs12201140, o cualquiera de sus combinaciones, es indicativa de que el tratamiento a administrar es dicha terapia combinada y/o la presencia del alelo G del polimorfismo rs12201030 es indicativa de que el tratamiento a 30 administrar es monoterapia de FAME no biológico.
19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 donde la enfermedad autoinmune se selecciona de la lista que comprende: artritis autoinmune,

espondiloartritis, lupus eritematoso sistémico, psoriasis y enfermedad inflamatoria intestinal.

- 5 20. Método según la reivindicación 19 donde la artritis autoinmune es artritis reumatoide.
21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20 donde la muestra biológica es sangre, plasma, suero, saliva, orina, líquido sinovial o linfa.
- 10 22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21 donde el FAME biológico es un agente bloqueante del factor de necrosis tumoral.
23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22 donde el sujeto es un humano.
- 15 24. Uso de los polimorfismos genéticos del gen *VIP* rs35643203, rs71575932 y/o rs7755568 como marcador pronóstico de enfermedad autoinmune en un sujeto que padece una enfermedad autoinmune.
- 20 25. Uso según la reivindicación 24 que además comprende el uso del polimorfismo genético del gen *VIP* rs3823082 y/o rs688136.
26. Uso según la reivindicación 25 que además comprende el uso de los polimorfismos genéticos del gen *VIP* seleccionados de la lista que comprende:
25 rs12213214, rs60946248, rs140023105, rs7764067, rs12201030, rs74760293, rs149081483 y rs12201140, o cualquiera de sus combinaciones.
27. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26 donde la enfermedad autoinmune se selecciona de la lista que comprende: artritis autoinmune,
30 espondiloartritis, lupus eritematoso sistémico, psoriasis y enfermedad inflamatoria intestinal.
28. Uso según la reivindicación 27 donde la artritis autoinmune es artritis reumatoide.
- 35 29. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 28 donde el sujeto es un humano.

30. Kit que comprende primers y/o sondas para detectar los polimorfismos genéticos del gen *VIP* rs35643203, rs71575932 y/o rs7755568.
- 5 31. Kit según la reivindicación 30 que además comprende primers y/o sondas para detectar el polimorfismo genético del gen *VIP* rs3823082 y/o rs688136.
32. Kit según la reivindicación 31 que además comprende primers y/o sondas que detectan los polimorfismos genéticos del gen *VIP* rs12213214, rs60946248, 10 rs140023105, rs7764067, rs12201030, rs74760293, rs149081483 y rs12201140, o cualquiera de sus combinaciones.
33. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 32 que además comprende anticuerpos, sondas o primers específicos para detectar anticuerpos antiproteínas 15 citrulinadas o péptidos citrulinados o proteínas citrulinadas .
34. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 33 para el pronóstico de una enfermedad autoinmune en un sujeto que padece dicha enfermedad.
- 20 35. Uso según la reivindicación 34 donde la enfermedad autoinmune se selecciona de la lista que comprende: artritis autoinmune, espondiloartritis, lupus eritematoso sistémico, psoriasis y enfermedad inflamatoria intestinal.
36. Uso según la reivindicación 35 donde la artritis autoinmune es artritis reumatoide. 25
37. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 34 a 36 donde el sujeto es un humano.
- 30

Fig. 1

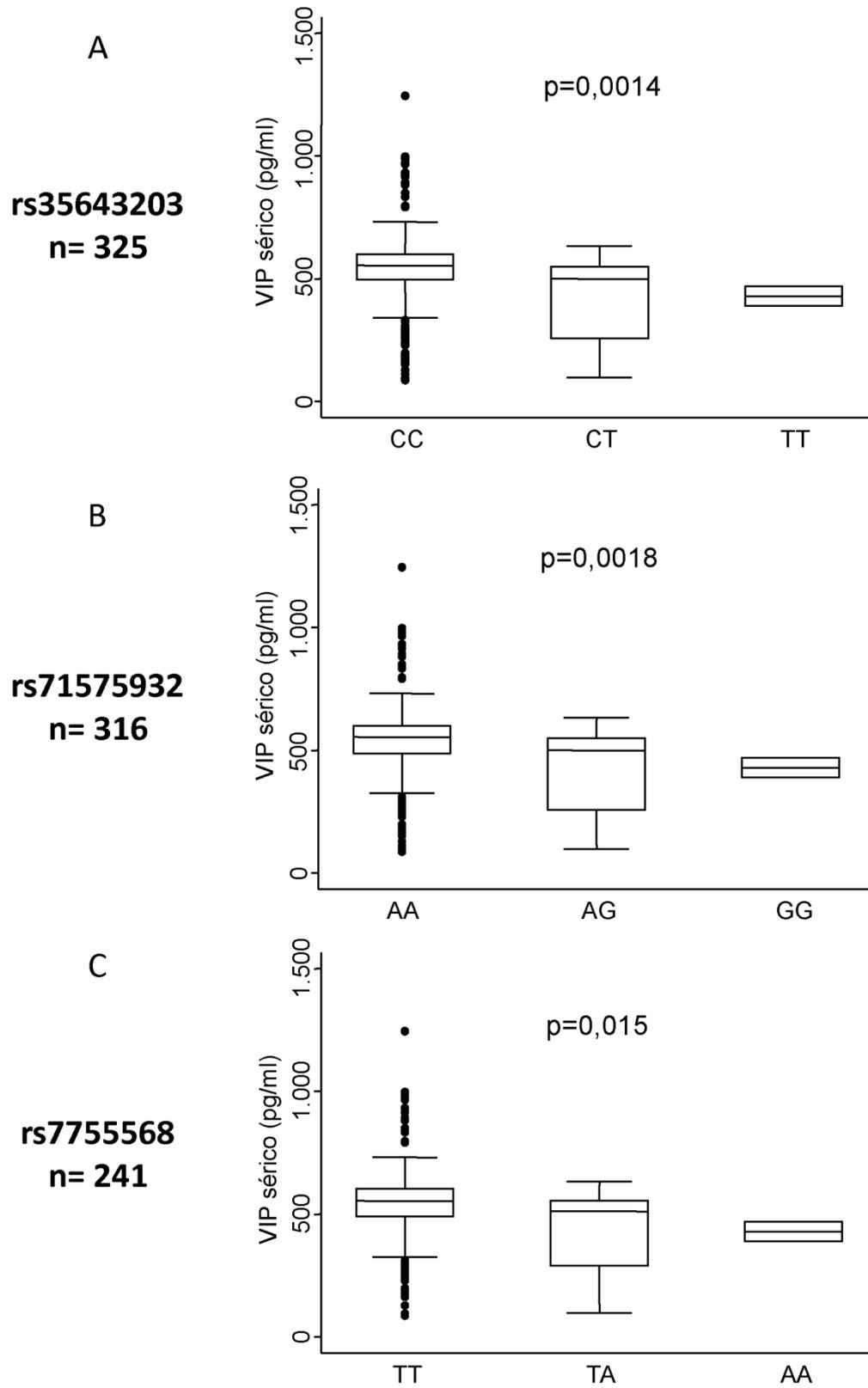


Fig. 2

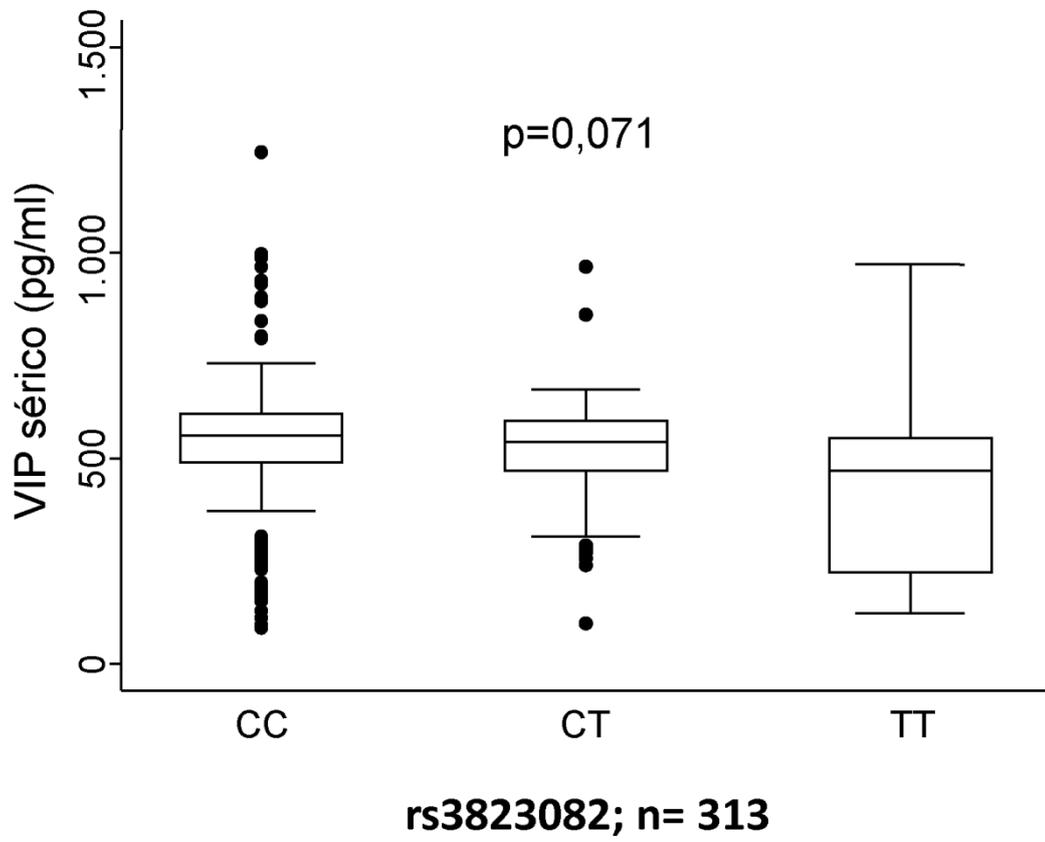
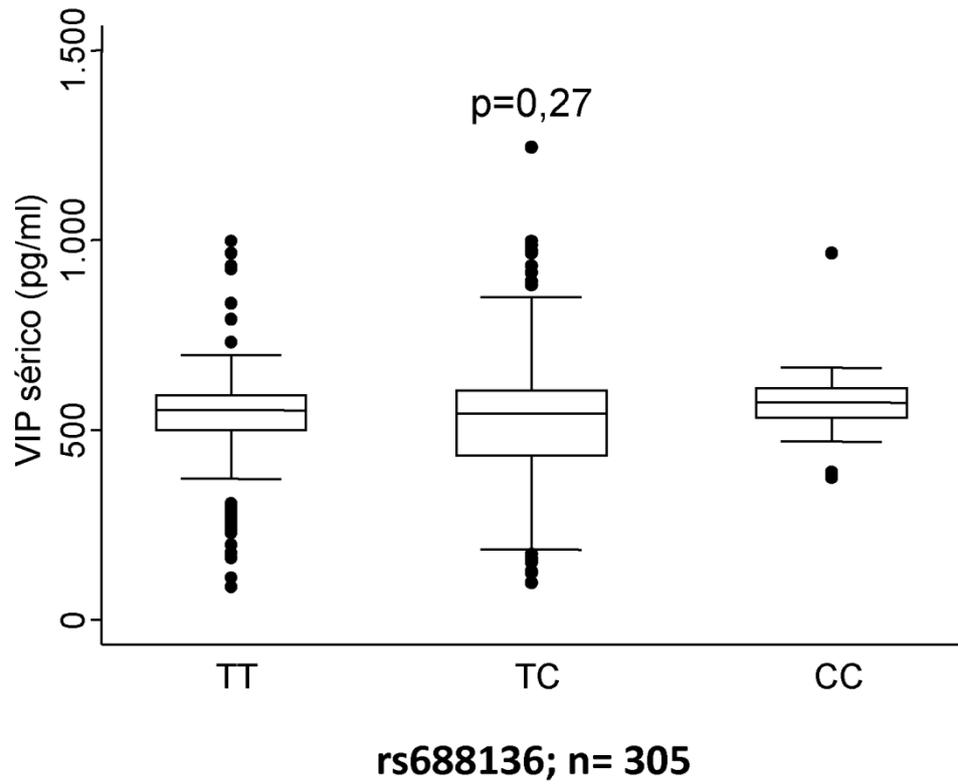


Fig. 3

A



B

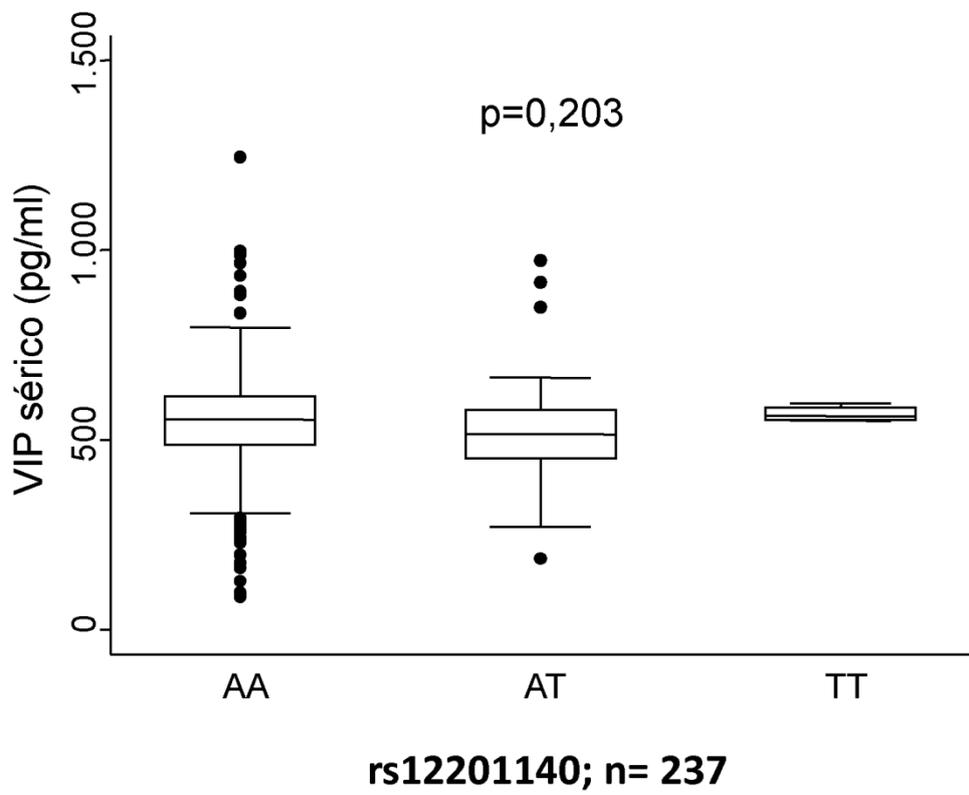


Fig. 4

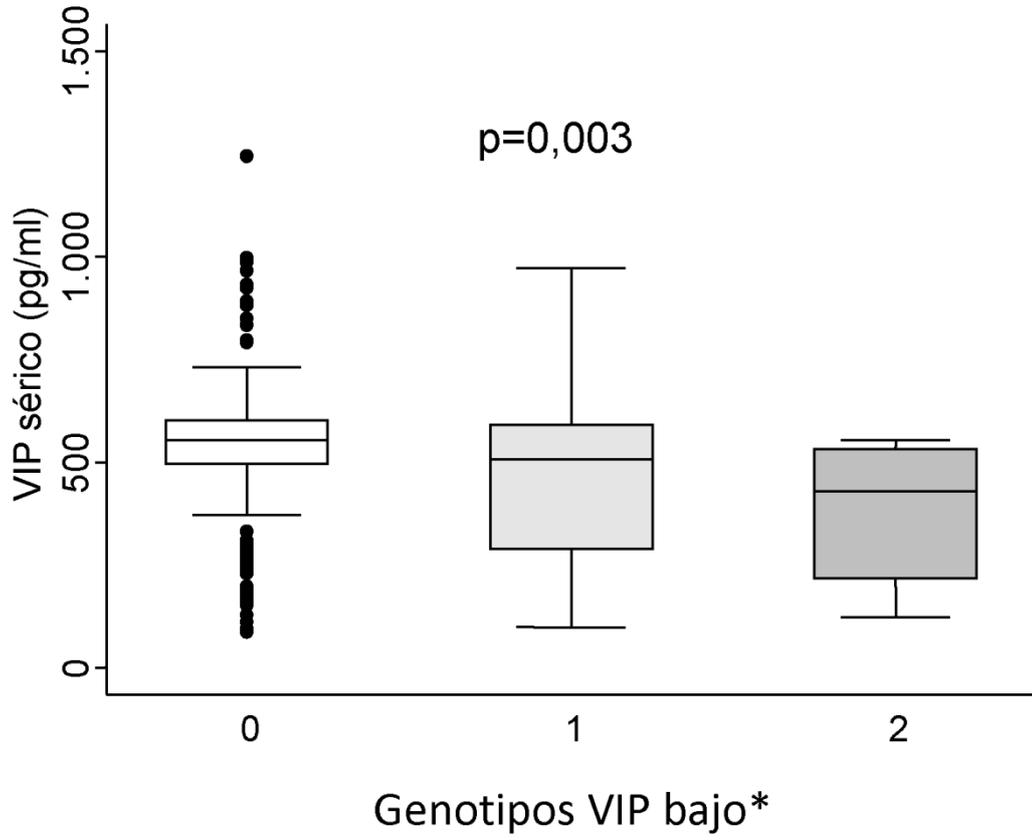


Fig. 5

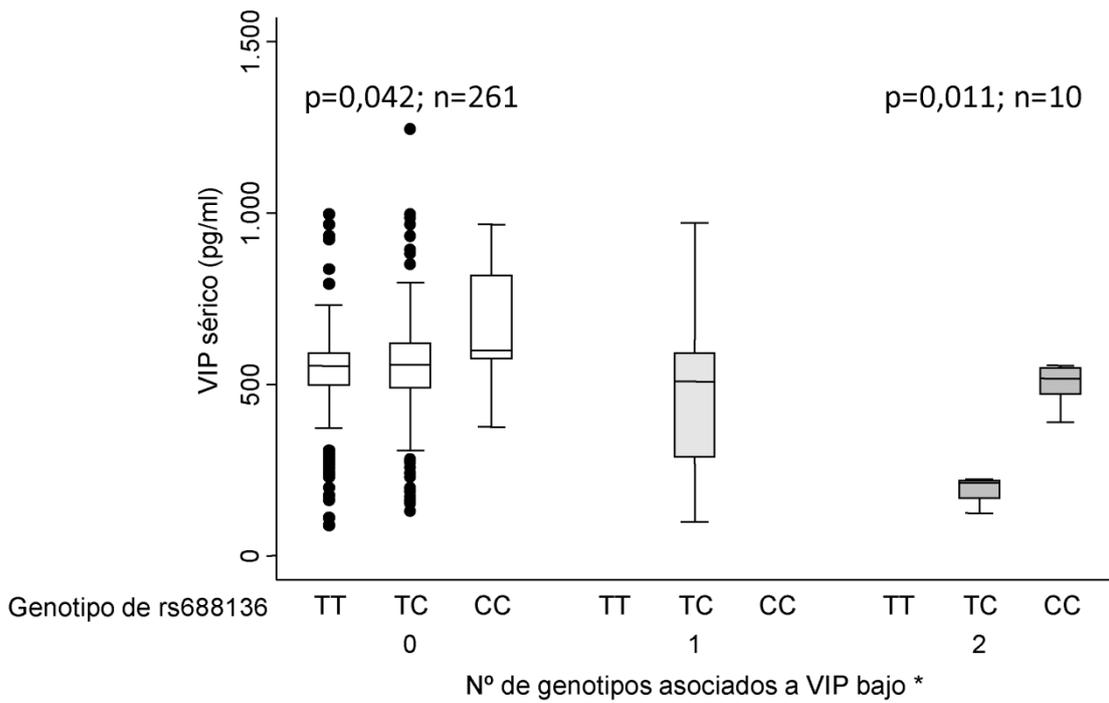


Fig. 6

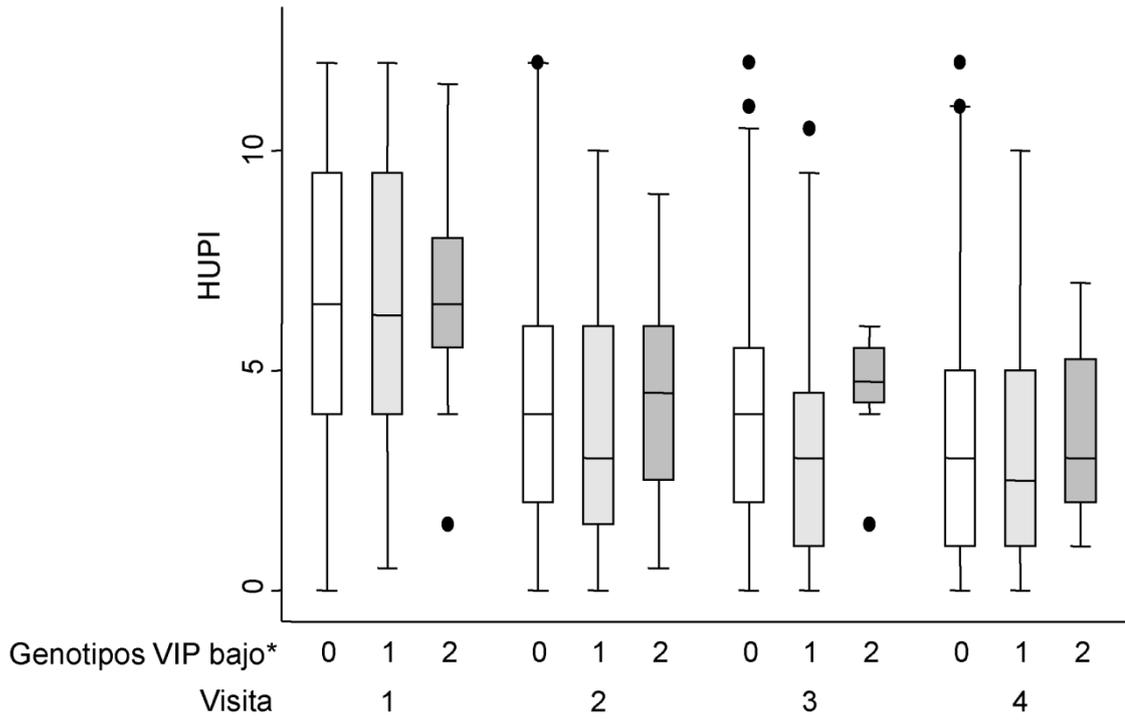


Fig. 7

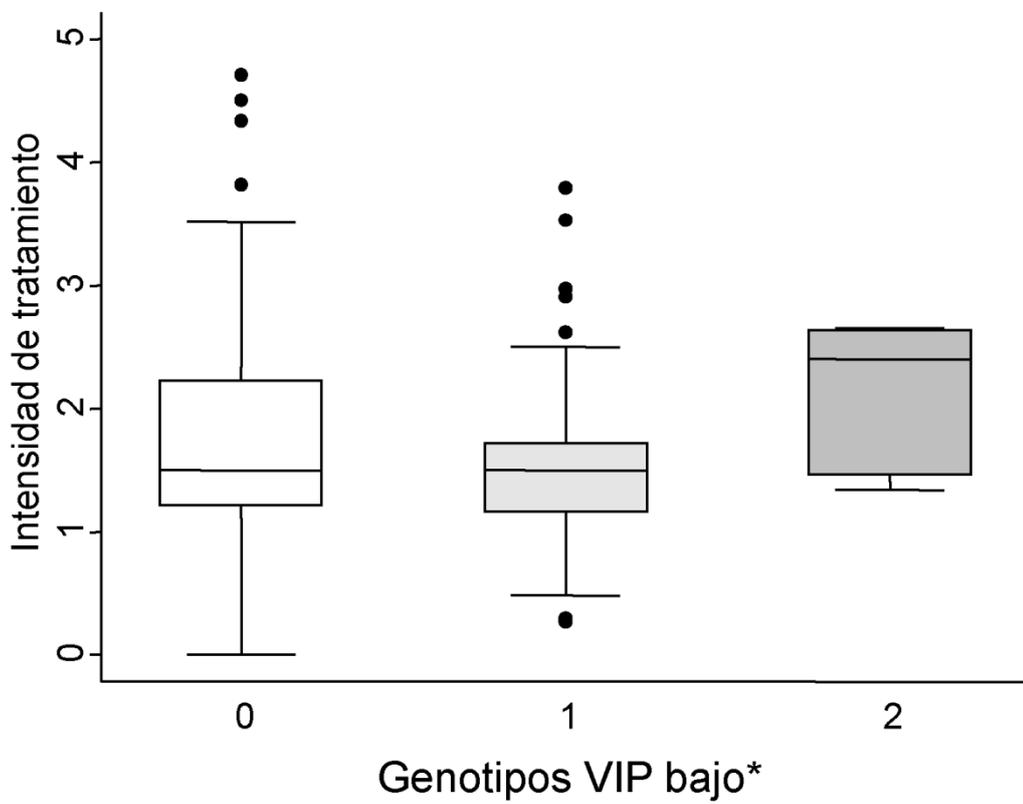


Fig. 8

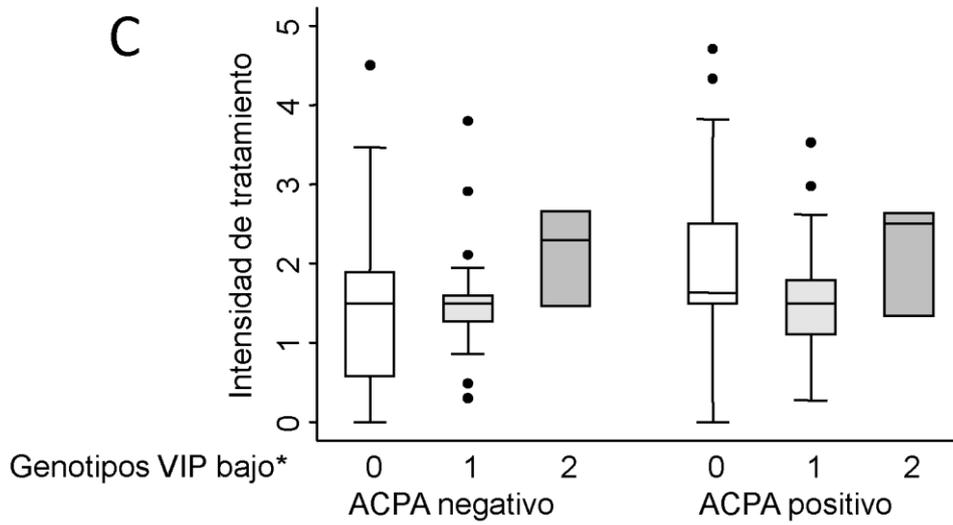
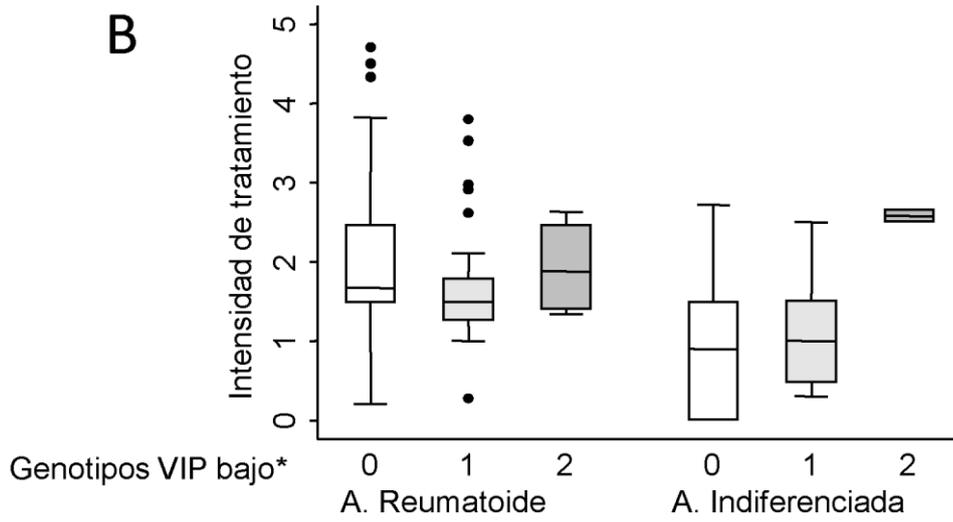
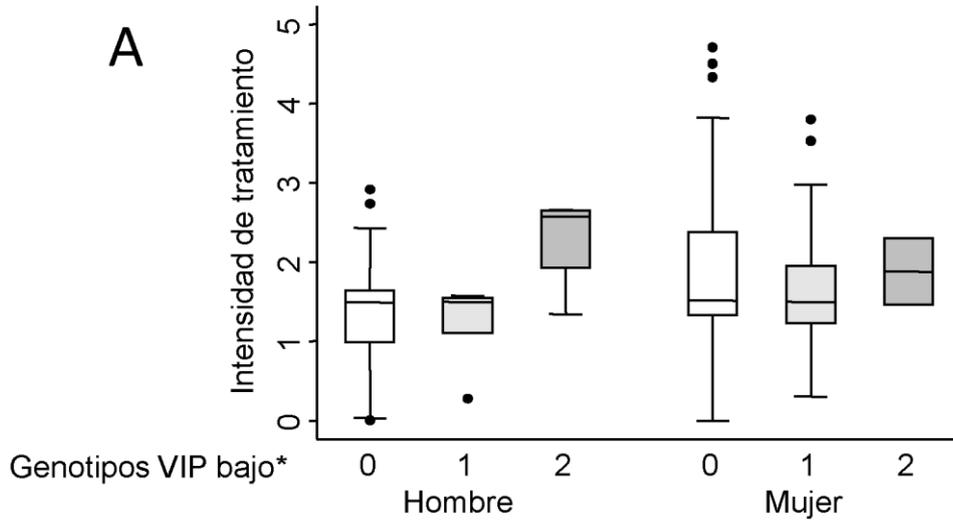


Fig. 9

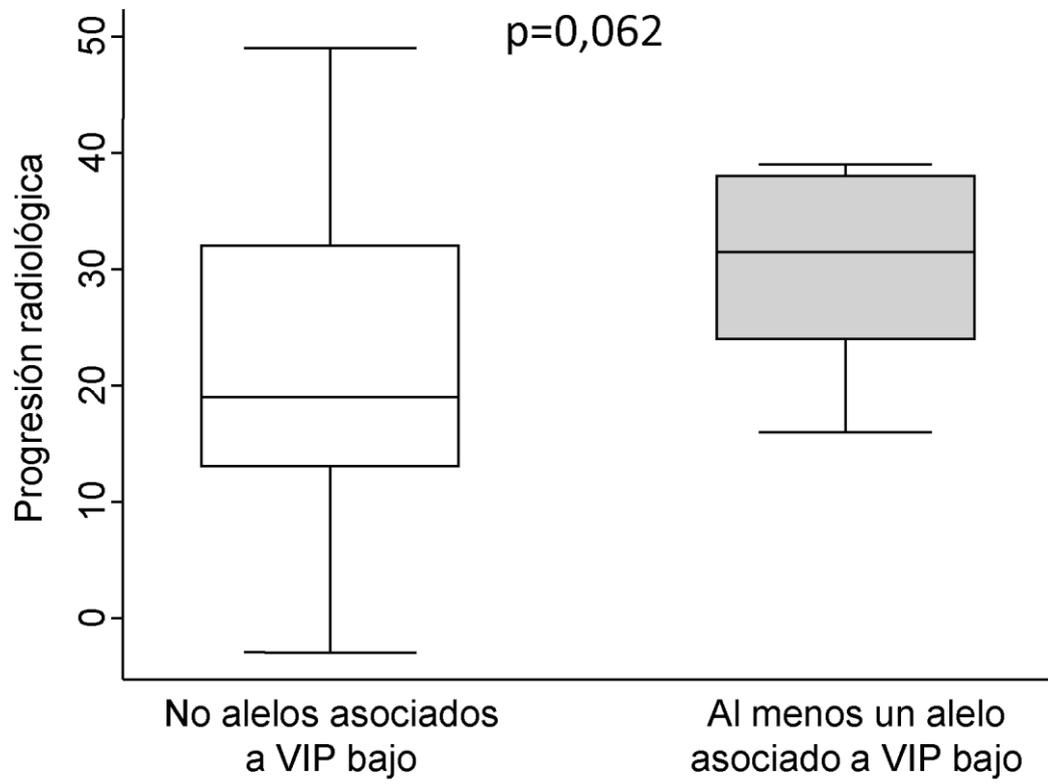


Fig.10

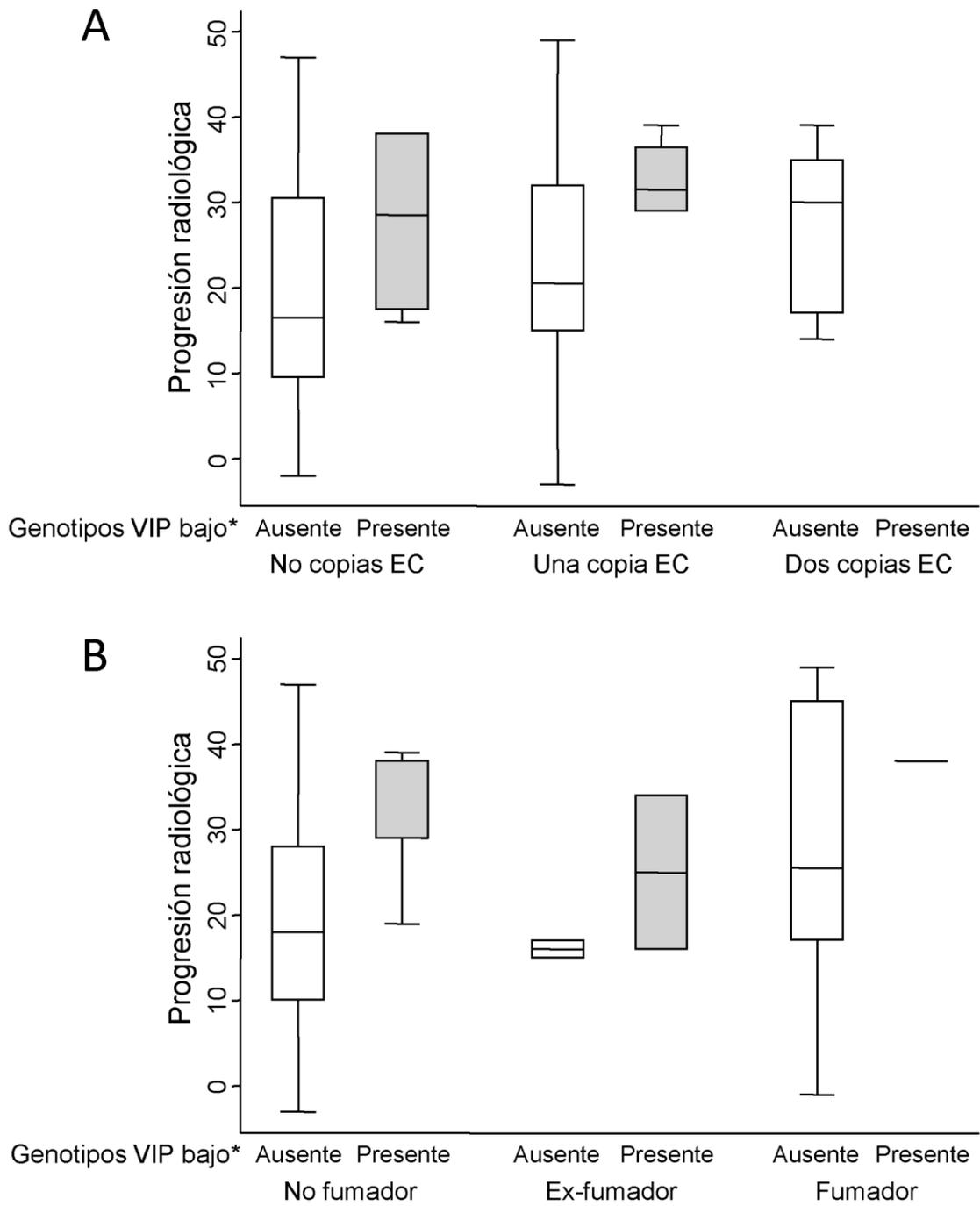
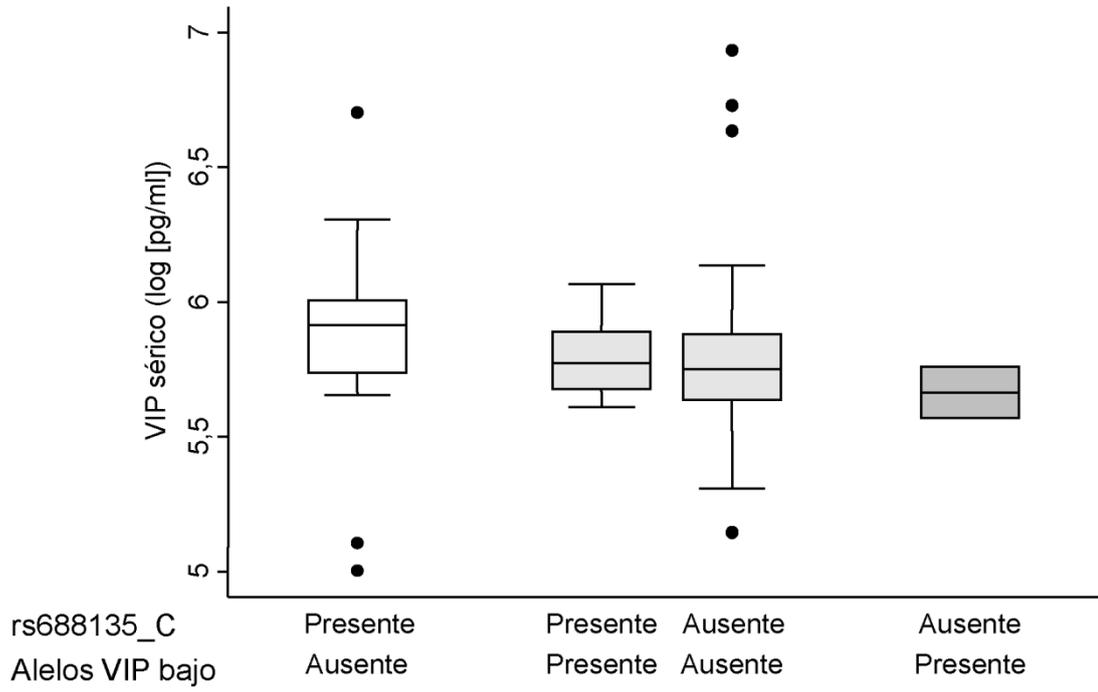


Fig. 11



<211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Primer antisentido para amplicón 2

 <400> 5
 ggccatggga tgaatagggc 20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Primer sentido para amplicón 3

 <400> 6
 tgaaggaatc ccaatggccc 20

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Primer antisentido para amplicón 3

 <400> 7
 gttccagagg caggagggaa a 21

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Primer sentido para amplicón 4

 <400> 8
 gagcacgact gggcgaggta 20

<210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Primer antisentido para amplicón 4

 <400> 9
 catacgaaat aggaaaaaaa aagca 25

<210> 10
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Primer sentido para amplicón 5

 <400> 10

tgtaagatgc tttaccctgc ttgctc	26
<210> 11	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Primer antisentido para amplicón 5	
<400> 11	
acattacttt ttcctctttc aattgtaga	29
<210> 12	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Primer sentido para amplicón 6	
<400> 12	
tgcttttttt ttcctatttc gtatg	25
<210> 13	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Primer antisentido para amplicón 6	
<400> 13	
cagtgacagg tgcttgaata aaaa	24
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Primer sentido para amplicón 7	
<400> 14	
gccaaccatg tgcccagaca	20
<210> 15	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Primer antisentido para amplicón 7	
<400> 15	
gaataaaaag aaagtgaaag cctcc	25
<210> 16	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> Primer sentido para amplicón 8
 <400> 16
 atgtgttgag tgagaggtgt ttgt 24
 <210> 17
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Primer antisentido para amplicón 8
 <400> 17
 cccgtaaact gaaaggaaa ttc 23
 <210> 18
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Primer sentido para amplicón 9
 <400> 18
 ggaggctttc actttctttt tattc 25
 <210> 19
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Primer antisentido para amplicón 9
 <400> 19
 tatctttcag tgatttgga gttg 24
 <210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Primer sentido para amplicón 10
 <400> 20
 gaattttcct ttcagtttac ggg 23
 <210> 21
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Primer antisentido para amplicón 10
 <400> 21
 cctgttccaa acatctctga agaaca 26
 <210> 22

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Primer sentido para amplicón 11
 <400> 22
 caactcccaa atcactgaaa gata 24

<210> 23
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Primer antisentido para amplicón 11
 <400> 23
 ttctttggtg taatttacta tgccaa 26

<210> 24
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Primer sentido para amplicón 12
 <400> 24
 tgttcttcag agatgtttgg aacagg 26

<210> 25
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Primer antisentido para amplicón 12
 <400> 25
 cttgatcagg ttcatttgct ccct 24

<210> 26
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Primer sentido para amplicón 13
 <400> 26
 ttggcatagt aaattacacc aaagaa 26

<210> 27
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Primer antisentido para amplicón 13
 <400> 27

caatgatgga agagttgcca agga 24

<210> 28
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Primer sentido para amplicón 14

<400> 28
 atggcttcat tcatcctgat tta 23

<210> 29
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Primer antisentido para amplicón 14

<400> 29
 caggcatttc taggagcaca tttca 25

<210> 30
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Primer sentido para amplicón 15

<400> 30
 caatgatgga agagttgcca agga 24

<210> 31
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Primer antisentido para amplicón 15

<400> 31
 gaaagttgac ccaagagttt actga 25

<210> 32
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Primer sentido para amplicón 16

<400> 32
 tgaaatgtgc tcctagaaat gcctg 25

<210> 33
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Primer antisentido para amplicón 16
 <400> 33
 tccatgggct tgatagatgt tattga 26
 <210> 34
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Primer sentido para amplicón 17
 <400> 34
 tcagtaaact ctgggtcaa ctttc 25
 <210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Primer antisentido para amplicón 17
 <400> 35
 ttttggcatg gcctgggact 20
 <210> 36
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Primer sentido para amplicón 18
 <400> 36
 tcaataacat ctatcaagcc catgga 26
 <210> 37
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Primer antisentido para amplicón 18
 <400> 37
 tgacgtttga ctggtacagg gtcttc 26
 <210> 38
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Primer sentido para amplicón 19
 <400> 38
 cagacaagat gacctctttg ccca 24
 <210> 39

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Primer antisentido para amplicón 19

 <400> 39
 tccctatact taattgagga gctaaca 27

 <210> 40
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Primer sentido para amplicón 20

 <400> 40
 gaagaccctg taccagtcaa acgtca 26

 <210> 41
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Primer antisentido para amplicón 20

 <400> 41
 tgggcaaaga ggtcatcttg tctg 24

 <210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Primer sentido para amplicón 21

 <400> 42
 cggtggtgtg gccctagaca 20

 <210> 43
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Primer antisentido para amplicón 21

 <400> 43
 ctccaaaggc ctttttcac attt 24

 <210> 44
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Primer sentido para amplicón 22

 <400> 44

cagacaagat gacctctttg ccca	24
<210> 45	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Primer antisentido para amplicón 22	
<400> 45	
tccctatact taattgagga gctaaca	27
<210> 46	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Primer sentido para amplicón 23	
<400> 46	
aaatgatgaa aaagaccttt ggag	24
<210> 47	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Primer antisentido para amplicón 23	
<400> 47	
caaacttaca ggtaaaacaa gctaaattt	29
<210> 48	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Primer sentido para amplicón 24	
<400> 48	
tgtagctcc tcaattaagt ataggga	27
<210> 49	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Primer antisentido para amplicón 24	
<400> 49	
gggtaattag tggacaaaag cagt	24
<210> 50	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> Primer sentido para amplicón 25
 <400> 50
 agccagattc caatccctaa cta 23

<210> 51
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Primer antisentido para amplicón 25
 <400> 51
 accatttaca aagcacagtg tgat 24

<210> 52
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Primer sentido para amplicón 26
 <400> 52
 actgcttttg tccactaatt accc 24

<210> 53
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Primer antisentido para amplicón 26
 <400> 53
 tctctttgtc ccttgtaac agc 23

<210> 54
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Primer sentido para amplicón 27
 <400> 54
 atcacactgt gctttgtaaa tggt 24

<210> 55
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Primer antisentido para amplicón 27
 <400> 55
 atacagcata tgaaattgca ggc 23

<210> 56

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Primer sentido para amplicón 28

 <400> 56
 gctgttaaca agggacaaag aga 23

 <210> 57
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Primer antisentido para amplicón 28

 <400> 57
 cagcattcca tctgcttaac attcaa 26

 <210> 58
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Primer sentido para amplicón 29

 <400> 58
 gcctgcaatt tcatatgctg tat 23

 <210> 59
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Primer antisentido para amplicón 29

 <400> 59
 tgagggatga gctggaaggg 20

 <210> 60
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia del virus M13 añadida al extremo 5' de los primers
 sentido

 <400> 60
 tgtaaaacga cgccagt 18

 <210> 61
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia del virus M13 añadida al extremo 5' de los primers
 antisentido

<400> 61
caggaaacag ctatgacc

18