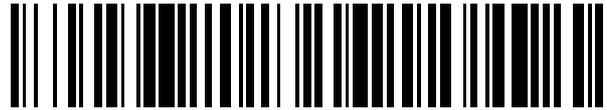


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 316**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2009 E 09740020 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2283156**

54 Título: **Detección de la predisposición genética a estados asociados con la osteoartritis**

30 Prioridad:

01.12.2008 US 118744 P
02.05.2008 US 49992 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2016

73 Titular/es:

INTERLEUKIN GENETICS, INC. (100.0%)
135 Beaver Street
Waltham, MA 02452, US

72 Inventor/es:

BUKOWSKI, JACK F.;
AZIZ, NAZNEEN;
WANG, HWA-YING;
HUTTNER, KENNETH;
ABRAMSON, STEVEN B y
ATTUR, MUKUNDAN

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 561 316 T3

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

DESCRIPCIÓN

Detección de la predisposición genética a estados asociados con la osteoartritis

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a un método y a kits para detectar una predisposición a, determinar el riesgo de, y guiar la terapia para: discapacidad y disminución de la función física asociada con gravedad de osteoartritis, progresión de osteoartritis y osteoartritis incidente.

10

Antecedentes

La osteoartritis (OA) es un trastorno crónico de las articulaciones caracterizado por la degeneración del cartílago articular y el hueso adyacente. La OA se considera generalmente una enfermedad degenerativa del envejecimiento, y la incidencia aumenta con la edad. La etiología de la osteoartritis es multifactorial, implicando factores tanto mecánicos como bioquímicos. La osteoartritis afecta comúnmente a las manos, los pies, la columna vertebral y articulaciones grandes fuera de la columna vertebral que soportan peso, tales como las caderas y las rodillas. Las articulaciones predominantemente afectadas son las que soportan peso e incluyen las rodillas, caderas, columna vertebral cervical y lumbosacra, y pies. Otras articulaciones comúnmente afectadas incluyen las articulaciones interfalángicas distales (DIP) e interfalángicas proximales (PIP) de las manos. La osteoartritis primaria se refiere de manera general a la osteoartritis sin causa conocida. La osteoartritis secundaria se refiere de manera general a la osteoartritis resultante de alguna lesión externa o interna o enfermedad (obesidad, traumatismo repetido o cirugía en las estructuras de las articulaciones, articulaciones anómalas en el nacimiento (anomalías congénitas), gota, diabetes y otros trastornos hormonales).

25

La progresión estructural de la OA se evalúa actualmente con vistas radiográficas simples midiendo la anchura del espacio articular (JSW) y/o el estrechamiento del espacio articular (JSN) a lo largo de un periodo de tiempo. (Altman *et al.*: Osteoarthritis Cartilage 1996, 4:217-243). La progresión de OA está asociada con una degradación acelerada del cartílago que conduce a estrechamiento del espacio articular, alteración dolorosa de la articulación y afectación funcional. La progresión de la enfermedad de OA se caracteriza por un patrón de expresión génica proinflamatorio en el cartílago y en el sinovio articular, con un aumento reactivo en la densidad ósea en el hueso subcondral.

30

La osteoartritis es la enfermedad articular en adultos más común, afectando al 5-20% de la población mundial y aumentando en cuanto a frecuencia y gravedad en todas las poblaciones que están envejeciendo. La prevalencia estimada en EE.UU. es de 15-60 millones de pacientes; 300-1200 millones en todo el mundo. La implicación de OA de la mano, rodilla, cadera y columna vertebral es común, representando las artroplastias totales de rodilla más de 300.000/año en los EE.UU. y 700.000 más en todo el mundo. Se espera que estas cifras aumenten en un 525% para 2030. Además, las artroplastias totales de cadera representan más de 150.000/año solo en los EE.UU. La OA puede implicar una única articulación o múltiples articulaciones en el mismo individuo, centrándose la terapia actual en el alivio del dolor ya que no hay ninguna terapia aprobada por la FDA que detenga o invierta el deterioro articular.

35

40

Dado el aumento previsto en la prevalencia de la osteoartritis, existe una necesidad de identificar factores de riesgo para discapacidad y disminución de la función física asociada con osteoartritis, progresión de osteoartritis y osteoartritis incidente. Varios estudios han implicado factores, incluyendo factores genéticos, envejecimiento, lesión y deformidad de las articulaciones, obesidad y deficiencias hormonales en la patogénesis de la osteoartritis. Para optimizar el tratamiento de la OA, es importante aumentar el conocimiento referente a los factores pronóstico de la progresión de OA. Tales factores pronóstico pueden usarse para identificar grupos de alto riesgo para el desarrollo (o la aparición) de OA y/o grupos de alto riesgo para la progresión de enfermedad grave de OA. Tal información de pacientes será clínicamente útil para el tratamiento clínico de pacientes con OA. Por ejemplo, si se sabe que un individuo con OA tiene un riesgo aumentado de progresión de enfermedad grave, el médico puede iniciar un tratamiento temprano con agentes modificadores de la enfermedad cuando estén disponibles. Tal información de pronóstico también puede ser clínicamente útil para orientar decisiones sobre el momento de cirugía de artroplastia. El conocimiento sobre factores pronóstico y la predisposición de un individuo para la aparición y la progresión grave de la enfermedad también es relevante para la investigación clínica, tal como para evaluar y desarrollar intervenciones terapéuticas incluyendo terapias modificadoras de la enfermedad. Por ejemplo, dado que generalmente un pequeño porcentaje de pacientes con OA muestran evidencias radiográficas de progresión de la enfermedad en el plazo de un periodo de uno a tres años, los ensayos clínicos de nuevos agentes terapéuticos suponen un reto. Dado que una parte sustancial de los sujetos de experimentos no mostrarán progresión de la enfermedad durante el estudio, tradicionalmente se necesitan grandes números de sujetos para diferenciar compuestos activos de placebo. Además, dado que muchos sujetos tratados pueden no tener ninguna progresión medible, y por tanto ningún beneficio por el fármaco medible, el valor percibido de un fármaco eficaz puede ser muy inferior a su valor real para pacientes que tienen OA progresiva.

45

50

55

60

Grandes cantidades de datos proporcionan apoyo para un papel central de la interleucina-1 (IL-1) en la patogénesis de la OA incluyendo modelos de susceptibilidad en animales, modelos de terapia dirigida a IL-1 y estudios de asociación genética. ((Loughlin *et al*, Arthritis Rheum 2002;46(6): 1519-27; Meulenbelt *et al*, Arthritis Rheum

65

2004;50(4):1 179-86; Moos *et al*, *Arthritis Rheum* 2000;43(11):2417-22; Stern *et al*, *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11(6):394-402; Smith *et al*, *Genes Immun* 2004;5(6):451-60; y Moxley *et al*, *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15(10):1 106-12). Por ejemplo, evidencias de la bibliografía sugieren que la predisposición genética es un determinante importante de la patología en pacientes con OA de mano (Moxley *et al*: *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15(10):1 106-12). El artículo de Stern *et al* (2003) comenta una asociación de osteoartritis de mano erosiva con un polimorfismo de un único nucleótido en el gen que codifica para IL- β . Aunque existe una bibliografía sustancial sobre el papel de la IL-1 y en menor medida de la TNF-alfa (Botha-Scheepers *et al*, *Ann Rheum Dis* 2007) sobre la patogénesis de la OA, se ha realizado menos trabajo sobre asociaciones genéticas de estos mediadores inflamatorios. Tales asociaciones son necesarias para desarrollar terapias que se dirijan de manera apropiada a subpoblaciones de pacientes con OA cuya enfermedad es muy probable que responda a inhibidores de IL-1 y TNF. Además, sigue habiendo una necesidad de un marcador fiable para predecir qué pacientes con osteoartritis experimentarán progresión de enfermedad grave.

Examen de genotipo

Los métodos tradicionales para examinar enfermedades hereditarias han dependido o bien de la identificación de productos génicos anómalos (por ejemplo, anemia falciforme) o bien de un fenotipo anómalo (por ejemplo, retraso mental). Estos métodos tienen una utilidad limitada para enfermedades hereditarias con aparición tardía y sin fenotipos fácilmente identificables tales como, por ejemplo, la enfermedad vascular. Con el desarrollo de metodología de examen genético sencilla y económica, ahora es posible identificar polimorfismos que indican una propensión a desarrollar enfermedad, incluso cuando la enfermedad es de origen poligénico. El número de enfermedades que pueden examinarse mediante métodos de biología molecular continúa creciendo al aumentar el entendimiento de la base genética de trastornos multifactoriales.

El examen genético (también denominado genotipado o examen molecular) puede definirse de manera amplia como pruebas para determinar si un paciente tiene mutaciones (alelos o polimorfismos) que o bien provocan un estado patológico o bien están "ligados" a la mutación que provoca un estado patológico. Ligamiento se refiere al fenómeno de que secuencias de ADN que están próximas entre sí en el genoma tienen tendencia a heredarse juntas. Dos secuencias pueden estar ligadas debido a alguna ventaja selectiva de la herencia conjunta. Sin embargo, más normalmente, dos secuencias polimórficas se heredan de manera conjunta debido a la infrecuencia relativa con la que se producen eventos de recombinación meiótica dentro de la región entre los dos polimorfismos. Se dice que los alelos polimórficos heredados de manera conjunta están en desequilibrio de ligamiento entre sí porque, en una población de seres humanos dada, tienden o bien a producirse ambos juntos o bien a no producirse en absoluto en cualquier miembro particular de la población. De hecho, cuando se encuentra que múltiples polimorfismos en una región cromosómica dada están en desequilibrio de ligamiento entre sí, definen un "haplotipo" genético casi estable. En cambio, eventos de recombinación que se producen entre dos loci polimórficos hacen que se separen en cromosomas homólogos diferenciados. Si la recombinación meiótica entre dos polimorfismos físicamente ligados se produce con suficiente frecuencia, parecerá que los dos polimorfismos se segregan independientemente y se dice que están en equilibrio de ligamiento.

Aunque la frecuencia de recombinación meiótica entre dos marcadores es generalmente proporcional a la distancia física entre ellos en el cromosoma, la aparición de "puntos calientes" así como regiones de recombinación cromosómica reprimida pueden dar como resultado discrepancias entre la distancia física y de recombinación entre dos marcadores. Por tanto, en determinadas regiones cromosómicas, múltiples loci polimórficos que abarcan un dominio cromosómico amplio pueden estar en desequilibrio de ligamiento entre sí, y de ese modo definir un haplotipo genético de amplia extensión. Además, cuando se encuentra una mutación que provoca enfermedad dentro de, o en ligación con, este haplotipo, pueden usarse uno o más alelos polimórficos del haplotipo como indicador de diagnóstico o de pronóstico de la probabilidad de desarrollar la enfermedad. Esta asociación entre polimorfismos por lo demás benignos y un polimorfismo que provoca enfermedad se produce si la mutación patológica surgió en el pasado reciente, de modo que no ha transcurrido tiempo suficiente para que se alcance el equilibrio mediante eventos de recombinación. Por tanto, la identificación de un haplotipo humano que abarca o está ligado con un cambio mutacional que provoca enfermedad, sirve como medida predictiva de la probabilidad de un individuo de haber heredado esa mutación que provoca enfermedad. De manera importante, tales procedimientos de pronóstico o diagnóstico pueden usarse sin necesitar la identificación y el aislamiento de la lesión real que provoca enfermedad. Esto es significativo porque la determinación precisa del defecto molecular implicado en un proceso patológico puede ser difícil y laboriosa, especialmente en el caso de enfermedades multifactoriales tales como trastornos inflamatorios.

De hecho, la correlación estadística entre un trastorno inflamatorio y un polimorfismo de IL-1 no indica necesariamente que el polimorfismo provoque directamente el trastorno. En vez de eso, el polimorfismo correlacionado puede ser una variante alélica benigna que está ligada con (es decir en desequilibrio de ligamiento con) una mutación que provoca trastorno que se ha producido en el pasado evolutivo reciente del ser humano, de modo que no ha transcurrido tiempo suficiente para que se alcance el equilibrio mediante eventos de recombinación en el segmento cromosómico intercalado. Por tanto, para los fines de ensayos de diagnóstico y de pronóstico para detectar una enfermedad particular, puede usarse la detección de un alelo polimórfico asociado con esa enfermedad sin tener en cuenta si el polimorfismo está directamente implicado en la etiología de la enfermedad. Además, cuando

un locus polimórfico benigno dado está en desequilibrio de ligamiento con un locus polimórfico que provoca enfermedad aparente, también es probable que todavía otros loci polimórficos que están en desequilibrio de ligamiento con el locus polimórfico benigno estén en desequilibrio de ligamiento con el locus polimórfico que provoca enfermedad. Por tanto, estos otros loci polimórficos también serán de pronóstico o diagnóstico de la probabilidad de haber heredado el locus polimórfico que provoca enfermedad. De hecho, puede seleccionarse como diana un haplotipo humano de amplia extensión (que describe el patrón típico de herencia conjunta de alelos de un conjunto de marcadores polimórficos ligados) para fines de diagnóstico una vez que se ha extraído una asociación entre una enfermedad o estado particular y un haplotipo humano correspondiente. Por tanto, la determinación de la probabilidad de un individuo de desarrollar una enfermedad o estado particular puede realizarse caracterizando uno o más alelos polimórficos asociados con enfermedad (o incluso uno o más haplotipos asociados con enfermedad) sin determinar o caracterizar necesariamente la variación genética causante.

Genética de la agrupación génica de IL-1

La agrupación génica de IL-1 está en el brazo largo del cromosoma 2 (2q13) y contiene al menos nueve genes de IL1, incluyendo los genes bien descritos para IL-1 α (IL-1A), IL-1 β (IL-1B) y el antagonista de receptor de IL-1 (IL-1RN), dentro de una región de 430 Kb (Nicklin, *et al.* (1994) *Genomics*, 19: 3824; Dunn 2001; Sims 2001; Nicklin 2002). Las moléculas agonistas, IL-1 α e IL-1 β , tienen una potente actividad proinflamatoria y están al inicio de muchas cascadas inflamatorias. Sus acciones, con frecuencia a través de la inducción de otras citocinas tales como IL-6 e IL-8, conducen a la activación y al reclutamiento de leucocitos en un tejido dañado, la producción local de agentes vasoactivos, y respuesta de fiebre en el cerebro y respuesta en fase aguda hepática. Las tres moléculas de IL-1 se unen a receptores de IL-1 de tipo I y de tipo II, pero sólo el receptor de tipo I transduce una señal al interior de la célula. En cambio, el receptor de tipo II se desprende de la membrana celular y actúa como receptor señuelo. Por tanto, el antagonista de receptor y el receptor de tipo II tienen ambas acciones antiinflamatorias.

La producción inapropiada de IL-1 desempeña un papel central en la patología de muchas enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias, incluyendo artritis reumatoide, trastorno inflamatorio del intestino, psoriasis y similares. Además, hay diferencias estables entre individuos en cuanto a las tasas de producción de IL-1, y parte de esta variación puede explicarse mediante diferencias genéticas en loci génicos de IL-1. Por tanto, los genes de IL-1 son candidatos razonables para determinar parte de la susceptibilidad genética a enfermedades inflamatorias, la mayoría de las cuales tienen una etiología multifactorial con un componente poligénico.

Se sabe que determinados alelos de la agrupación génica de IL-1 están asociados con estados patológicos particulares. Por ejemplo, se ha notificado que el alelo 2 de IL-1RN (VNTR) (patente estadounidense n.º 5.698.399) y el alelo 1 de IL-1RN (VNTR) (Keen R W *et al.*, (1998) *Bone* 23:367-371) están asociados con OA. Además, se ha notificado que el alelo 2 de IL-1RN (VNTR) está asociado con nefropatía en diabetes mellitus (Blakemore, *et al.* (1996) *Hum. Genet* 97(3): 369-74), alopecia areata (Cork, *et al.*, (1995) *J. Invest. Dermatol.* 104(5 Sup.): 15S-16S; Cork *et al.* (1996) *Dermatol Clin* 14: 671-8), enfermedad de Graves (Blakemore, *et al.* (1995) *J. Clin. Endocrinol.* 80(1): 111-5), lupus eritematoso sistémico (Blakemore, *et al.* (1994) *Arthritis Rheum.* 37: 1380-85), liquen escleroso (Clay, *et al.* (1994) *Hum. Genet.* 94: 407-10) y colitis ulcerosa (Mansfield, *et al.* (1994) *Gastroenterol.* 106(3): 63742)).

Además, se ha encontrado que el alelo 2 de IL-1A del marcador -889 y el alelo 2 de IL-1B (TaqI) del marcador +3954 están asociados con enfermedad periodontal (patente estadounidense n.º 5.686.246; Kornman y diGiovine (1998) *Ann Periodont* 3: 327-38; Hart y Kornman (1997) *Periodontol* 2000 14: 202-15; Newman (1997) *Compend Contin Educ Dent* 18: 8814; Kornman *et al.* (1997) *J. Clin Periodontol* 24: 72-77). También se ha encontrado que el alelo 2 de IL-1A del marcador -889 está asociado con artritis crónica juvenil, particularmente iridociclitis crónica (McDowell, *et al.* (1995) *Arthritis Rheum.* 38: 221-28). También se ha encontrado que el alelo 2 de IL-1B (TaqI) del marcador +3954 de IL-1B está asociado con psoriasis y diabetes insulino dependiente en pacientes con DR3/4 (di Giovine, *et al.* (1995) *Cytokine* 7: 606; Pociot, *et al.* (1992) *Eur J. Clin. Invest.* 22: 396-402). Adicionalmente, también se ha encontrado que el alelo 1 de IL-1RN (VNTR) está asociado con retinopatía diabética (véase el documento estadounidense con n.º de serie 09/037472 y el documento PCT/GB97/02790). Además, se ha encontrado que el alelo 2 de IL-1RN (VNTR) está asociado con colitis ulcerosa en poblaciones caucásicas de Norteamérica y Europa (Mansfield, J. *et al.*, (1994) *Gastroenterology* 106: 637-42). Resulta interesante que esta asociación es particularmente fuerte dentro de poblaciones de judíos Ashkenazi étnicamente relacionados (documento PCT WO97/25445).

Sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos novedosos para determinar si un sujeto corre riesgo de progresión de enfermedad grave y estrechamiento del espacio articular de osteoartritis. En un aspecto, la presente invención proporciona un método de detección de la predisposición para el riesgo de progresión de enfermedad grave y estrechamiento del espacio articular de osteoartritis en un sujeto que comprende detectar en el sujeto el genotipo en IL1RN rs9005 G>A;

en el que la presencia de genotipo G/G indica que el sujeto tiene predisposición a la progresión de enfermedad grave y el estrechamiento del espacio articular y la ausencia de este genotipo indica que el sujeto no tiene

predisposición a los mismos; y

en el que la presencia de genotipo A/A o G/A indica que el sujeto está protegido frente a la progresión a enfermedad grave y el estrechamiento del espacio articular y la ausencia de estos genotipos indica que el sujeto no está protegido frente a los mismos.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona el método anterior para seleccionar sujetos con osteoartritis para su inclusión en o exclusión de ensayos clínicos.

La disminución de la función física asociada con OA puede determinarse usando cualquier método conocido en la técnica, tal como midiendo la anchura del espacio articular (JSW) y/o el estrechamiento del espacio articular (JSN).

Según algunas realizaciones, se proporcionan métodos para seleccionar sujetos con osteoartritis para su inclusión en o exclusión de ensayos clínicos basándose en la probabilidad de su progresión de la enfermedad y estrechamiento del espacio articular de osteoartritis que comprenden determinar el tipo del ácido nucleico del sujeto en el locus polimórfico IL 1RN rs9005 G>A, en los que el genotipo del sujeto con respecto a dicho locus proporciona información sobre el riesgo del sujeto para la progresión de enfermedad grave de osteoartritis, y permite la selección de sujetos de estudio que son adecuados para los criterios del ensayo clínico.

Preferiblemente, la etapa de detección del método se selecciona del grupo que consiste en: a) hibridación de oligonucleótidos específica de alelo; b) análisis del tamaño; c) secuenciación; d) hibridación; e) digestión con 5' nucleasa; f) polimorfismo de conformación monocatenario; g) hibridación específica de alelo; h) extensión específica de cebador; e i) ensayo de ligación de oligonucleótidos. Preferiblemente, antes de, o junto con, la detección, se somete la muestra de ácido nucleico a una etapa de amplificación.

Según algunas realizaciones, el método de la invención comprende además proporcionar recomendaciones para el tratamiento médico de la osteoartritis basándose en las necesidades predichas del sujeto a una determinada edad.

En la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones se exponen otras realizaciones y ventajas de la invención.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La presente invención se basa al menos en parte, en la identificación de determinados patrones de haplotipo y alelos inflamatorios y la asociación (hasta un grado estadísticamente significativo) de estos patrones con el desarrollo de estados relacionados con OA tales como progresión de la enfermedad de OA y progresión de JSN. Por tanto, la detección de los alelos que comprenden haplotipos y alelos asociados con OA en un sujeto puede indicar que el sujeto tiene o tiene predisposición al desarrollo de un estado relacionado con OA particular. La osteoartritis también se conoce por muchos otros nombres: enfermedad degenerativa de las articulaciones, artritis hipertrófica, artritis traumática y osteoartritis (Rottensten K., Chronic Dis Can. 1996; 17(3-4):92-107).

La progresión de la enfermedad de OA puede definirse en cuanto al grado de discapacidad, empeoramiento radiográfico de OA y/o la necesidad de cirugía (Dougados M., Arthritis Rheum. mayo de 2004; 50(5): 1360-5). La progresión de la enfermedad en osteoartritis es habitualmente lenta, y se produce a lo largo de años o décadas. La tasa de progresión es variable entre individuos, y muchos pacientes con osteoartritis clínicamente diagnosticada pueden no padecer progresión apreciable o bien por sus síntomas o bien por cambios radiográficos a lo largo de largos periodos. La progresión radiográfica grave es la complicación más temida de la OA, ya que sugiere una destrucción irreversible de las articulaciones.

Por tanto, la invención proporciona un método de detección de la predisposición para el riesgo de progresión de enfermedad grave y estrechamiento del espacio articular de osteoartritis en un sujeto que comprende detectar en el sujeto el genotipo en IL1RN rs9005 G>A; en el que la presencia de genotipo G/G indica que el sujeto tiene predisposición a la progresión de enfermedad grave y el estrechamiento del espacio articular y la ausencia de este genotipo indica que el sujeto no tiene predisposición a los mismos; y en el que la presencia de genotipo A/A o G/A indica que el sujeto está protegido frente a la progresión a enfermedad grave y el estrechamiento del espacio articular y la ausencia de estos genotipos indica que el sujeto no está protegido frente a los mismos.

El conocimiento de los alelos particulares asociados con una susceptibilidad a desarrollar osteoartritis, junto o combinado con información sobre otros factores contribuyentes de OA permite una personalización de la prevención o el tratamiento según el perfil genético del individuo, el objetivo de la "farmacogenómica". Por tanto, la comparación del perfil genético de un individuo con el perfil de la población para osteoartritis permite la selección de fármacos u otros regímenes terapéuticos que se espera que sean seguros y eficaces para un paciente o población de pacientes particular (es decir, un grupo de pacientes que tienen la misma alteración genética). Pueden centrarse recursos médicos de manera temprana en aquellos pacientes que corren riesgo de progresión y enfermedad grave.

Cualquier régimen de tratamiento o preventivo requiere un nivel de compromiso por parte del médico y el sujeto. Los

métodos de la presente invención ayudan a garantizar que se da el nivel requerido de atención a aquellos que tienen predisposición a riesgo aumentado de estados asociados con OA. Tales sujetos pueden elegir usar de manera agresiva fármacos contra la osteoartritis modificadores de la enfermedad (DMOAD), también denominados fármacos contra la osteoartritis modificadores de la estructura (SMOAD). Los DMOAD o agentes terapéuticos contra la OA se refieren a cualquier agente o régimen terapéutico (incluyendo medios farmacéuticos, nutracéuticos y quirúrgicos) que previene o retrasa el desarrollo de, o alivia los síntomas de, osteoartritis en el sujeto. El agente terapéutico puede ser un polipéptido, peptidomimético, ácido nucleico u otra molécula orgánica o inorgánica, preferiblemente una "molécula pequeña" incluyendo vitaminas, minerales y otros nutrientes. Los DMOAD incluyen, pero no se limitan a, glucosamina, sulfato de condroitina, doxiciclina, risedronato, diacereína e hialuronano i.a. Los métodos de la presente invención ayudarán a los médicos, pacientes y aseguradoras a decidir quién necesita estas modalidades.

Otra cuestión es la cirugía de artroplastia. La articulación sometida a artroplastia sólo dura 15 años, por lo que con frecuencia son necesarias segundas cirugías difíciles en pacientes más jóvenes. Los métodos de la presente invención pueden usarse para gestionar el tratamiento de la OA basándose en la probabilidad de progresión radiográfica. Los métodos de la presente invención pueden usarse para evaluar la probabilidad de que un sujeto requiera una primera o segunda cirugía de artroplastia.

Con frecuencia la edad es una consideración cuando se decide el momento de la cirugía. La edad también influye en esa progresión de enfermedad. Para los fines del tratamiento médico de la OA, la edad puede dividirse en niveles asignándose opciones de tratamiento o desenlaces médicos a cada nivel. De esta manera, la progresión de la enfermedad puede tratarse a lo largo de toda la vida del sujeto. Pueden definirse cuatro niveles de edad como < 40 años, 40-55 años, 56-70 años y >70 años.

Varias escalas de clasificación en grados están disponibles para que los expertos en la técnica correlacionen el grado radiográfico de osteoartritis con el grado real de degeneración de cartilago articular dentro de cualquier articulación particular. Estas incluyen, pero no se limitan a, escalas de clasificación en grados de Kellgren-Lawrence, Ahlback y Brandt. Véase Kellgren J, Lawrence J. Radiologic assessment of osteoarthritis. Ann Rheum Dis 1957; 16: 494-501; Ahlback S. Osteoarthritis of the knee: a radiographic investigation. Acta Radiol Diagn (Stockh) 1968; [sup. 227]: 7-72; Brandt K, Fife R, Braunstein E, Katz B. Radiographic grading of the severity of knee osteoarthritis: relation of the Kellgren and Lawrence grade to a grade based on joint space narrowing and correlation with arthroscopic evidence of articular cartilage degeneration. Arthritis Rheum 1989; 32:1584 -1591. El de Kellgren-Lawrence es el método preferido para evaluar la presencia y la gravedad de la osteoartritis. A continuación se proporciona una breve explicación de la escala de clasificación en grados radiográfica de Kellgren-Lawrence y la escala de clasificación en grados radiográfica de Brandt. Un experto en la técnica apreciará las diferencias en los criterios y/o la metodología de estos y otros sistemas de clasificación en grados conocidos en la técnica, también se aprecia que estos sistemas de clasificación en grados son equivalentes para la evaluación de la presencia y la gravedad de la osteoartritis.

40 Escala de clasificación en grados radiográfica de Kellgren-Lawrence de osteoartritis

Grado de Osteoartritis	
Descripción	
0 - Ninguna	Sin hallazgos radiográficos de osteoartritis
1 - Dudosa	Osteofitos minúsculos de dudosa significación clínica
2 - Mínima	Osteofitos definidos con espacio articular no afectado
3 - Moderada	Osteofitos definidos con estrechamiento del espacio articular moderado
4 - Grave	Osteofitos definidos con estrechamiento del espacio articular grave y esclerosis subcondral

Escala de clasificación en grados radiográfica de Brandt de osteoartritis

Grado de Osteoartritis	
Descripción	
0 - Ninguna	Sin hallazgos radiográficos de osteoartritis
1 - Dudosa	< 25% de estrechamiento del espacio articular con características secundarias
2 - Mínima	50-75% de estrechamiento del espacio articular sin características secundarias
3 - Moderada	50-75% de estrechamiento del espacio articular con características secundarias
4 - Grave	> 75% de estrechamiento del espacio articular con características secundarias

Medición de la progresión de OA y progresión de JSW.

La conservación de la integridad del cartílago articular se considera generalmente un aspecto importante de la OA que debe medirse en la evaluación de la eficacia de cualquier tratamiento y como medida importante de evaluación de la progresión de la enfermedad de OA. La distancia entre huesos en la radiografía simple es la mejor medida sustituta disponible para el grosor del cartílago articular. La pérdida de espacio articular dentro de la rodilla se ha equiparado con la pérdida de cartílago articular. Por tanto, es común que los médicos cuantifiquen este deterioro midiendo la cantidad de espacio entre los diferentes componentes de la articulación. Un estrechamiento del espacio articular indica un empeoramiento de la osteoartritis. El estrechamiento del espacio articular (JSN) se usa con frecuencia como medida de desenlace para normalizar la posición radioanatómica de la articulación en exámenes radiológicos en serie.

El estrechamiento del espacio articular o adelgazamiento del cartílago articular asociado con OA puede medirse usando cualquier método conocido en la técnica. La obtención de imágenes por resonancia magnética es un método preferido para monitorizar la estructura de la articulación. La anchura del espacio articular (JSW) radiográfica por artrografía de doble contraste es un método preferido. Se prefieren mediciones continuas de JSW. Alternativamente, puede usarse una JSW mínima (es decir, JSW del compartimento medial medida en el punto más estrecho). La progresión de OA puede medirse comparando la frecuencia con la que los sujetos muestran pérdida de JSW. Esta frecuencia u otra medida de la tasa de JSN puede usarse para medir la progresión de OA.

Ensayos clínicos

Hay varios estudios que notifican los ensayos clínicos de supuestos fármacos contra OA modificadores de la enfermedad (DMOAD). Los métodos de la presente invención le permitirán a un investigador seleccionar sujetos de estudio que corren un riesgo aumentado o un riesgo disminuido (dependiendo de los objetivos del estudio) de progresión de la enfermedad de OA. Según una realización, se proporcionan métodos para seleccionar sujetos con osteoartritis para su inclusión en ensayos clínicos basándose en su predisposición a la progresión de la enfermedad y tasa aumentada de estrechamiento del espacio articular de osteoartritis. Los sujetos que tienen un genotipo que indica que el sujeto tiene predisposición a riesgos aumentados de progresión de la enfermedad y/o estrechamiento del espacio articular de osteoartritis pueden seleccionarse en un estudio que investiga la eficacia de determinados DMOAD. Los métodos de la presente invención pueden usarse para seleccionar sujetos de estudio para ensayos clínicos que investigan la eficacia y seguridad de terapias para OA, la progresión de la enfermedad de OA y/o la tasa de JSN.

Además, la capacidad de seleccionar como diana poblaciones que se espera que muestren el mayor beneficio clínico, basándose en el perfil genético, puede permitir: 1) el reposicionamiento de fármacos ya comercializados; 2) el rescate de candidatos farmacológicos cuyo desarrollo clínico se ha interrumpido como un resultado de limitaciones de seguridad o eficacia, que son específicos para subgrupos de pacientes; y 3) un desarrollo acelerado y menos costoso de agentes terapéuticos candidatos y un etiquetado de fármacos más óptimo (por ejemplo, ya que la medición del efecto de diversas dosis de un agente sobre la mutación causante es útil para optimizar la dosis eficaz).

Detección de alelos

Pueden identificarse patrones de haplotipo detectando cualquiera de los alelos componentes usando cualquiera de una variedad de técnicas disponibles, incluyendo: 1) realizar una reacción de hibridación entre una muestra de ácido nucleico y una sonda que puede hibridarse con el alelo; 2) secuenciar al menos una parte del alelo; o 3) determinar la movilidad electroforética del alelo o fragmentos del mismo (por ejemplo, fragmentos generados mediante digestión con endonucleasa). El alelo puede someterse opcionalmente a una etapa de amplificación antes de la realización de la etapa de detección. Se seleccionan métodos de amplificación preferidos del grupo que consiste en: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), clonación y variaciones de los anteriores (por ejemplo RT-PCR y amplificación específica de alelo). Pueden seleccionarse oligonucleótidos necesarios para la amplificación, por ejemplo, del interior de los loci génicos de IL-1, o bien que flanquean el marcador de interés (tal como se requiere para amplificación por PCR) o bien que se solapan directamente con el marcador (tal como en la hibridación por ASO). En una realización particularmente preferida, la muestra se hibrida con un conjunto de cebadores, que se hibridan en 5' y 3' en una secuencia sentido o antisentido con el alelo asociado con enfermedad vascular, y se somete a una amplificación por PCR.

También puede detectarse un alelo indirectamente, por ejemplo analizando el producto de proteína codificado por el ADN. Por ejemplo, cuando el marcador en cuestión da como resultado la traducción de una proteína mutante, la proteína puede detectarse mediante cualquiera de una variedad de métodos de detección de proteínas. Tales métodos incluyen inmunodetección y pruebas bioquímicas, tales como fraccionamiento por tamaño, en el que la proteína tiene un cambio del peso molecular aparente mediante truncamiento, elongación, plegamiento alterado o modificaciones postraduccionales alteradas.

Una orientación general para diseñar cebadores para amplificación de secuencias genómicas cromosómicas humanas únicas es que presentan una temperatura de fusión de al menos aproximadamente 50°C, en la que puede estimarse una temperatura de fusión aproximada usando la fórmula $T_{fus} = [2X(n.º \text{ de A o T}) + 4X(n.º \text{ de G o C})]$.

5 Están disponibles muchos métodos para detectar alelos específicos en loci polimórficos humanos. El método preferido para detectar un alelo polimórfico específico dependerá, en parte, de la naturaleza molecular del polimorfismo. Por ejemplo, las diversas formas alélicas del locus polimórfico pueden diferir en un único par de bases del ADN. Tales polimorfismos de un único nucleótido (o SNP) son agentes de contribución principales de la variación genética, que comprenden aproximadamente el 80% de todos los polimorfismos conocidos, y se estima que su densidad en el genoma humano es en promedio de 1 por cada 1.000 pares de bases. Los SNP se producen con la mayor frecuencia de forma bialélica únicamente en dos formas diferentes (aunque en teoría son posibles hasta cuatro formas diferentes de un SNP, correspondientes a las cuatro bases de nucleótidos diferente que se producen en el ADN). No obstante, los SNP son mutacionalmente más estables que otros polimorfismos, haciendo que sean adecuados para estudios de asociación adecuados en los que se usa el desequilibrio de ligamiento entre marcadores y una variante desconocida para mapear mutaciones que provocan enfermedad. Además, dado que los SNP normalmente sólo tienen dos alelos, pueden genotiparse mediante un ensayo de positivo/negativo simple en vez de una medición de longitud, haciendo que sean más susceptibles de automatización.

20 Está disponible una variedad de métodos para detectar la presencia de un alelo polimórfico de un único nucleótido particular en un individuo. Avances en este campo han proporcionado genotipado de SNP a gran escala preciso, fácil y económico. Por ejemplo, muy recientemente se han descrito varias técnicas nuevas incluyendo hibridación específica de alelo dinámica (DASH), electroforesis en gel diagonal en serie de microplacas (MADGE), pirosecuenciación, ligación específica de oligonucleótidos, el sistema TaqMan así como diversas tecnologías de "chip" de ADN tales como los chips de SNP Affymetrix. Estos métodos requieren la amplificación de la región genética diana, normalmente mediante PCR. Todavía otros métodos recién desarrollados, basados en la generación de pequeñas moléculas de señal mediante escisión invasiva seguido por espectrometría de masas o sondas candado inmovilizadas y amplificación en círculo rodante, podrían eliminar eventualmente la necesidad de PCR. A continuación se resumen varios de los métodos conocidos en la técnica para detectar polimorfismos de un único nucleótido específicos. Se entiende que el método de la presente invención incluye todos los métodos disponibles.

30 Se han desarrollado varios métodos para facilitar el análisis de polimorfismos de un único nucleótido. En una realización, el polimorfismo de una única base puede detectarse usando un nucleótido resistente a exonucleasa especializado, tal como se da a conocer, por ejemplo, en Mundy, C. R. (patente estadounidense n.º 4.656.127). Según el método, se permite que un cebador complementario a la secuencia alélica inmediatamente en 3' con respecto al sitio polimórfico se hibride con una molécula diana obtenida de un animal o ser humano particular. Si el sitio polimórfico en la molécula diana contiene un nucleótido que es complementario al derivado de nucleótido resistente a exonucleasa particular presente, entonces ese derivado se incorporará al final del cebador hibridado. Tal incorporación hace que el cebador sea resistente a exonucleasa, y de ese modo permite su detección. Dado que se conoce la identidad del derivado resistente a exonucleasa de la muestra, un hallazgo de que el cebador se ha vuelto resistente a exonucleasas revela que el nucleótido presente en el sitio polimórfico de la molécula diana era complementario al del derivado de nucleótido usado en la reacción. Este método tiene la ventaja de que no requiere la determinación de grandes cantidades de datos de secuencias externas.

45 Opcionalmente, se usa un método basado en disolución para determinar la identidad del nucleótido de un sitio polimórfico. Cohen, D. *et al.* (patente francesa 2.650.840; solicitud de PCT n.º WO91/02087). Como en el método de Mundy de la patente estadounidense n.º 4.656.127, se emplea un cebador que es complementario a secuencias alélicas inmediatamente en 3' con respecto a un sitio polimórfico. El método determina la identidad del nucleótido de ese sitio usando derivados de didesoxinucleótidos marcados, que, si son complementarios al nucleótido del sitio polimórfico, se incorporarán en el extremo terminal del cebador.

50 Un método alternativo, conocido como análisis de fragmentos genéticos o GBA™ se describe por Goelet, P. *et al.* (solicitud de PCT n.º 92/15712). El método de Goelet, P. *et al.* usa mezclas de terminadores marcados y un cebador que es complementario a la secuencia en 3' con respecto a un sitio polimórfico. Por tanto, el terminador marcado que se incorpora se determina mediante el, y es complementario al, nucleótido presente en el sitio polimórfico de la molécula diana que está evaluándose. Al contrario que el método de Cohen *et al.* (patente francesa 2.650.840; solicitud de PCT n.º WO91/02087) el método de Goelet, P. *et al.* es preferiblemente un ensayo en fase heterogénea, en el que el cebador o la molécula diana se inmoviliza en una fase sólida.

60 Recientemente, se han descrito varios procedimientos de incorporación de nucleótidos guiados por cebador para someter a ensayo sitios polimórficos en ADN (Komher, J. S. *et al.*, Nucl. Acids. Res. 17:7779-7784 (1989); Sokolov, B. P., Nucl. Acids Res. 18:3671 (1990); Syvanen, A.-C., *et al.*, Genomics 8:684-692 (1990); Kuppuswamy, M. N. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1143-1147 (1991); Prezant, T. R. *et al.*, Hum. Mutat. 1:159-164 (1992); Ugozzoli, L. *et al.*, GATA 9:107-112 (1992); Nyren, P. *et al.*, Anal. Biochem. 208:171-175 (1993)). Estos métodos se diferencian de GBA™ en cuanto a que todos ellos se basan en la incorporación de desoxinucleótidos marcados para distinguir entre bases en un sitio polimórfico. En un formato de este tipo, dado que la señal es proporcional al número de desoxinucleótidos incorporados, los polimorfismos que se producen en tramos del mismo nucleótido

pueden dar como resultado señales que son proporcionales a la longitud del tramo (Syvanen, A.-C., *et al.*, Amer. J. Hum. Genet. 52:46-59 (1993)).

Para mutaciones que producen terminación prematura de la traducción de la proteína, la prueba de truncamiento de proteína (PTT) ofrece un enfoque de diagnóstico eficaz (Roest, *et al.*, (1993) Hum. Mol. Genet. 2:1719-21; van der Luijt, *et al.*, (1994) Genomics 20:1-4). Para PTT, inicialmente se aísla ARN de tejido disponible y se somete a transcripción inversa, y se amplifica mediante PCR el segmento de interés. Entonces se usan los productos de PCR de transcripción inversa como molde para la amplificación por PCR anidada con un cebador que contiene un promotor de ARN polimerasa y una secuencia para iniciar la traducción eucariota. Tras la amplificación de la región de interés, los motivos únicos incorporados en el cebador permiten la transcripción y traducción *in vitro* secuencial de los productos de PCR. Tras la electroforesis en gel de poli(acrilamida-dodecilsulfato de sodio) de productos de traducción, la aparición de polipéptidos truncados indica la presencia de una mutación que provoca la terminación prematura de la traducción. En una variación de esta técnica, se usa ADN (como contraposición a ARN) como molde de PCR cuando la región de interés diana se deriva de un único exón.

Puede utilizarse cualquier tipo de célula o tejido para obtener muestras de ácido nucleico para su uso en el diagnóstico descrito en el presente documento. En una realización preferida, la muestra de ADN se obtiene de un líquido corporal, por ejemplo, sangre, obtenida mediante técnicas conocidas (por ejemplo venopunción) o saliva. Alternativamente, pueden realizarse pruebas de ácido nucleico en muestras secas (por ejemplo cabello o piel). Cuando se usa ARN o proteína, las células o tejidos que pueden usarse deben expresar un gen de IL-1.

También pueden realizarse procedimientos de diagnóstico *in situ* directamente sobre secciones de tejido (fijadas y/o congeladas) de tejido de paciente obtenido de biopsias o resecciones, de tal manera que no se necesita ninguna purificación de ácido nucleico. Pueden usarse reactivos de ácido nucleico como sondas y/o cebadores para tales procedimientos *in situ* (véase, por ejemplo, Nuovo, G. J., 1992, PCR *in situ* hybridization: protocols and applications, Raven Press, NY).

Además de métodos que se centran principalmente en la detección de una secuencia de ácido nucleico, también pueden evaluarse perfiles en tales esquemas de detección. Pueden generarse perfiles de huellas, por ejemplo, usando un procedimiento de presentación diferencial, análisis de tipo Northern y/o RT-PCR.

Un método de detección preferido es la hibridación específica de alelo usando sondas que se solapan con una región de al menos un alelo de un haplotipo proinflamatorio de IL-1 y que tienen aproximadamente 5, 10, 20, 25 ó 30 nucleótidos alrededor de la mutación o región polimórfica. Preferiblemente, varias sondas que pueden hibridarse específicamente con otras variantes alélicas implicadas en una reestenosis se unen a un soporte de fase sólida, por ejemplo, un "chip" (que puede contener hasta aproximadamente 250.000 oligonucleótidos). Pueden unirse oligonucleótidos a un soporte sólido mediante una variedad de procedimientos, incluyendo litografía. El análisis de detección de mutación usando estos chips que comprenden oligonucleótidos, también denominadas "alineamientos de sondas de ADN", se describe, por ejemplo, en Cronin *et al.* (1996) Human Mutation 7:244. Opcionalmente, un chip comprende todas las variantes alélicas de al menos una región polimórfica de un gen. Entonces se pone en contacto el soporte de fase sólida con un ácido nucleico de prueba y se detecta la hibridación con las sondas específicas. Por consiguiente, puede identificarse la identidad de numerosas variantes alélicas de uno o más genes en un experimento de hibridación simple.

Estas técnicas también pueden comprender la etapa de amplificar el ácido nucleico antes del análisis. Los expertos en la técnica conocen técnicas de amplificación e incluyen, pero no se limitan a, clonación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la polimerasa de alelos específicos (ASA), reacción en cadena de la ligasa (LCR), reacción en cadena de la polimerasa anidada, replicación de secuencias autosostenida (Guatelli, J. C. *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), sistema de amplificación de la transcripción (Kwoh, D. Y. *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177) y Q-beta replicasa (Lizardi, P. M. *et al.*, 1988, Bio/Technology 6:1197).

Pueden someterse a ensayo productos de amplificación de una variedad de maneras, incluyendo análisis del tamaño, digestión por restricción seguida por análisis del tamaño, detección de cebadores oligonucleotídicos marcados con etiqueta específicos en los productos de reacción, hibridación de oligonucleótidos específicos de alelo (ASO), detección de 5'-exonucleasa específica de alelo, secuenciación, hibridación, y similares.

Los medios de detección basados en PCR pueden incluir amplificación múltiple de una pluralidad de marcadores simultáneamente. Por ejemplo, en la técnica se conoce bien seleccionar cebadores de PCR para generar productos de PCR que no se solapan en cuanto al tamaño y que pueden analizarse simultáneamente. Alternativamente, es posible amplificar diferentes marcadores con cebadores que están marcados de manera diferencial y por tanto pueden detectarse cada uno de manera diferencial. Evidentemente, los medios de detección basados en hibridación permiten la detección diferencial de múltiples productos de PCR en una muestra. En la técnica se conocen otras técnicas para permitir análisis de múltiple de una pluralidad de marcadores.

En una realización meramente ilustrativa, el método incluye las etapas de (i) recoger una muestra de células de un

paciente, (ii) aislar ácido nucleico (por ejemplo, genómico, ARNm o ambos) de las células de la muestra, (iii) poner en contacto la muestra de ácido nucleico con uno o más cebadores que se hibridan específicamente en 5' y 3' con al menos un alelo de un haplotipo proinflamatorio de IL-1 en condiciones de tal manera que se produce hibridación y amplificación del alelo, y (iv) detectar el producto de amplificación. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si tales moléculas están presentes en cantidades muy bajas.

En una realización preferida del método, el alelo de un haplotipo proinflamatorio de IL-1 se identifica mediante alteraciones en patrones de escisión con enzimas de restricción. Por ejemplo, se aísla ADN de muestra y de control, se amplifica (opcionalmente), se digiere con una o más endonucleasas de restricción, y se determinan los tamaños de longitud de fragmentos mediante electroforesis en gel.

En aún otra realización, puede usarse cualquiera de una variedad de reacciones de secuenciación conocidas en la técnica para secuenciar directamente el alelo. Las reacciones de secuenciación a modo de ejemplo incluyen aquellas basadas en técnicas desarrolladas por Maxim y Gilbert ((1977) Proc. Natl Acad Sci USA 74:560) o Sanger (Sanger *et al* (1977) Proc. Nat. Acad. Sci USA 74:5463). También se contempla que puede usarse cualquiera de una variedad de procedimientos de secuenciación automatizados cuando se realizan los ensayos objeto (véase, por ejemplo Biotechniques (1995) 19:448), incluyendo secuenciación mediante espectrometría de masas (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 94/16101; Cohen *et al.* (1996) Adv Chromatogr 36:127-162; y Griffin *et al.* (1993) Appl Biochem Biotechnol 38:147-159). Resultará evidente para un experto en la técnica que, para determinadas realizaciones, se necesita determinar la aparición de sólo una, dos o tres de las bases de ácido nucleico en la reacción de secuenciación. Por ejemplo, puede llevarse a cabo localización de residuos de A o similar, por ejemplo, cuando sólo se detecta un ácido nucleico.

En una realización adicional, puede usarse protección frente a agentes de escisión (tales como una nucleasa, hidroxilamina o tetróxido de osmio y con piperidina) para detectar bases con apareamiento erróneo en heterodúplex de ARN/ARN o ARN/ADN o ADN/ADN (Myers, *et al.* (1985) Science 230:1242). En general, la técnica de "escisión de apareamiento erróneo" comienza proporcionando heterodúplex formados mediante hibridación de ARN o ADN (marcado) que contiene el alelo de tipo natural con la muestra. Los dúplex bicatenarios se tratan con un agente que escinde regiones monocatenarias del dúplex tales como las que existirán debido a apareamientos erróneos de pares de bases entre las cadenas de control y de muestra. Por ejemplo, pueden tratarse dúplex de ARN/ADN con ARNasa y tratarse híbridos de ADN/ADN con S1 nucleasa para digerir enzimáticamente las regiones con apareamiento erróneo. En otras realizaciones, pueden tratarse dúplex o bien ADN/ADN o bien ARN/ADN con hidroxilamina o tetróxido de osmio y con piperidina con el fin de digerir regiones con apareamiento erróneo. Tras la digestión de las regiones con apareamiento erróneo, entonces se separa el material resultante por tamaño sobre geles de poliacrilamida desnaturalizantes para determinar el sitio de mutación. Véase, por ejemplo, Cotton *et al* (1988) Proc. Natl Acad Sci USA 85:4397; y Saleeba *et al* (1992) Methods Enzymol. 217:286-295. En una realización preferida, el ADN o ARN de control puede marcarse para su detección.

En todavía otra realización, la reacción de escisión de apareamiento erróneo emplea una o más proteínas que reconocen pares de bases con apareamiento erróneo en ADN bicatenario (las denominadas enzimas "de reparación de apareamiento erróneo de ADN"). Por ejemplo, la enzima mutY de *E. coli* escinde A en apareamientos erróneos de G/A y la timidina ADN glicosilasa de células HeLa escinde T en apareamientos erróneos de G/T (Hsu *et al.* (1994) Carcinogenesis 15:1657-1662). Según una realización a modo de ejemplo, se hibrida una sonda basada en un alelo de un haplotipo de locus de IL-1 con un ADNc u otro producto de ADN de una(s) célula(s) de prueba. Se trata el dúplex con una enzima de reparación de apareamiento erróneo de ADN, y los productos de escisión, si los hay, pueden detectarse a partir de protocolos de electroforesis o similares. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.459.039.

En otras realizaciones, se usarán alteraciones en la movilidad electroforética para identificar un alelo de locus de IL-1. Por ejemplo, puede usarse polimorfismo de conformación monocatenario (SSCP) para detectar diferencias en la movilidad electroforética entre ácidos nucleicos mutantes y de tipo natural (Orita *et al.* (1989) Proc Natl. Acad. Sci USA 86:2766, véase también Cotton (1993) Mutat Res 285:125-144; y Hayashi (1992) Genet Anal Tech Appl 9:73-79). Se desnaturalizan fragmentos de ADN monocatenario de alelos de locus de IL-1 de muestra y de control y se deja que vuelvan a naturalizarse. La estructura secundaria de ácidos nucleicos monocatenarios varía según la secuencia, la alteración resultante en la movilidad electroforética permite la detección incluso de un cambio de una única base. Los fragmentos de ADN pueden marcarse o detectarse con sondas marcadas. La sensibilidad del ensayo puede potenciarse usando ARN (en vez de ADN), en el que la estructura secundaria es más sensible a un cambio en la secuencia. En una realización preferida, el método objeto usa análisis de heterodúplex para separar moléculas de heterodúplex bicatenarias basándose en cambios en la movilidad electroforética (Keen *et al.* (1991) Trends Genet 7:5).

En aún otra realización, se somete a ensayo el movimiento de alelos en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente de agente desnaturalizante usando electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) (Myers *et al.* (1985) Nature 313:495). Cuando se usa DGGE como método de análisis, se modificará el ADN para garantizar que no se desnaturaliza completamente, por ejemplo añadiendo un anclaje de GC de aproximadamente 40 pb de ADN rico en GC con alto punto de fusión mediante PCR. En una realización adicional, se usa un gradiente

de temperatura en lugar de un gradiente de agente desnaturante para identificar diferencias en la movilidad de ADN de control y de muestra (Rosenbaum y Reissner (1987) Biophys Chem 265:12753).

5 Los ejemplos de otras técnicas para detectar alelos incluyen, pero no se limitan a, hibridación de oligonucleótidos selectiva, amplificación selectiva, o extensión de cebadores selectiva. Por ejemplo, pueden prepararse cebadores oligonucleotídicos en los que la mutación conocida o diferencia de nucleótidos (por ejemplo, en variantes alélicas) se sitúa de manera central y después se hibrida con ADN diana en condiciones que permiten hibridación únicamente si se encuentra un apareamiento perfecto (Saiki *et al.* (1986) Nature 324:163); Saiki *et al.* (1989) Proc. Natl Acad. Sci USA 86:6230). Tales técnicas de hibridación de oligonucleótido específicas de alelo pueden usarse para someter a prueba una mutación o región polimórfica por cada reacción cuando se hibridan oligonucleótidos con ADN diana amplificado por PCR o varias mutaciones o regiones polimórficas diferentes cuando los oligonucleótidos se unen a la membrana de hibridación y se hibridan con ADN diana marcado.

15 Alternativamente, puede usarse tecnología de amplificación específica de alelo que depende de la amplificación por PCR selectiva junto con la presente invención. Los oligonucleótidos usados como cebadores para la amplificación específica pueden portar la mutación o región polimórfica de interés en el centro de la molécula (de modo que la amplificación depende de la hibridación diferencial) (Gibbs *et al.* (1989) Nucleic Acids Res. 17:2437-2448) o en el extremo 3' de un cebador en el que, en condiciones apropiadas, puede evitarse el apareamiento erróneo, o reducir la extensión de polimerasa (Prossner (1993) Tibtech 1 1:238). Además, puede ser deseable introducir un sitio de restricción novedoso en la región de la mutación para crear detección basada en escisión (Gasparini *et al.* (1992) Mol. Cell Probes 6:1). Se espera que en determinadas realizaciones también puede realizarse amplificación usando ligasa Taq para la amplificación (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci USA 88:189). En tales casos, se producirá ligación únicamente si hay un apareamiento perfecto en el extremo 3' de la secuencia en 5' haciendo posible detectar la presencia de una mutación conocida en un sitio específico buscando la presencia o ausencia de amplificación.

30 En otra realización, se lleva a cabo la identificación de la variante alélica usando un ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA), tal como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 4.998.617 y en Landegren, U. *et al.* ((1988) Science 241:1077-1080). El protocolo de OLA usa dos oligonucleótidos que están diseñados para poder hibridarse con secuencias contiguas de una única cadena de una diana. Uno de los oligonucleótidos está unido a un marcador de separación, por ejemplo, biotilado, y el otro está marcado de manera detectable. Si se encuentra la secuencia complementaria precisa en una molécula diana, los oligonucleótidos se hibridarán de tal manera que sus extremos terminales sean contiguos, y crearán un sustrato de ligación. La ligación permite entonces recuperar el oligonucleótido marcado usando avidina, u otro ligando de biotina. Nickerson, D. A. *et al.* han descrito un ensayo de detección de ácido nucleico que combina atributos de PCR y OLA (Nickerson, D. A. *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8923-27). En este método, se usa PCR para lograr la amplificación exponencial de ADN diana, que entonces se detecta usando OLA.

40 Se han desarrollado varias técnicas basadas en este método de OLA y pueden usarse para detectar alelos de un haplotipo de locus de IL-1. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.593.826 da a conocer un OLA usando un oligonucleótido que tiene un grupo amino en 3' y un oligonucleótido fosforilado en 5' para formar un conjugado que tiene un enlace fosforamidato. En otra variación de OLA descrita en Tobe *et al.* ((1996) Nucleic Acids Res 24: 3728), OLA combinado con PCR permite determinar el tipo de dos alelos en un único pocillo de microtitulación. Marcando cada uno de los cebadores específicos de alelo con un hapteno único, es decir digoxigenina y fluoresceína, cada reacción de OLA puede detectarse usando anticuerpos específicos de hapteno que están marcados con diferentes indicadores enzimáticos, fosfatasa alcalina o peroxidasa del rábano. Este sistema permite la detección de los dos alelos usando un formato de alto rendimiento que conduce a la producción de dos colores diferentes.

50 Los cebadores particularmente preferidos para su uso en un método de diagnóstico incluyen SEQ ID NO: 1-25.

SNP	SEQ ID NO	Propósito	Secuencia
IL1RN rs9005 G>A	SEQ ID NO: 1	PCR	TGAGCAAATGTGGCTCCTGG GGGTCT
	SEQ ID NO: 2	PCR	CCCAAAGCCTGTCAAGGCCA AGGACAT
	SEQ ID NO: 3	SBE	GATGGCTGTGCCTCTGCCTGT CTCCCCACC
IL1RN rs419598 T>C	SEQ ID NO: 4	PCR	ACAAGTTCTGGGGACACAG
	SEQ ID NO: 5	PCR	AGGCCATGGTGCTGCAGACA
	SEQ ID NO: 6	SBE	GACCTTCTATCTGAGGAACA ACCAACTAGTTGC

IL 1RN rs315952 T>C	SEQ ID NO: 7	PCR	GCCTCAGCTCTCACCTGCCCCA TCTTTTG
	SEQ ID NO: 8	PCR	AGGCAGCATGGAGGCTGGTC AGTTGAA
	SEQ ID NO: 9	SBE	GACAAGCGCTTCGCCTTCATC CGCTCAGACAG
PCR = Reacción en cadena de la polimerasa SBE = Genotipado por extensión de una única base			

El diseño de oligonucleótidos adicionales para su uso en la amplificación y detección de alelos polimórficos de IL-1 se facilita por la disponibilidad tanto de información de secuencia actualizada del cromosoma humano 2q 13 (que contiene el locus de IL-1 humana) como de información de polimorfismos humanos actualizada disponible para este locus. Por ejemplo, la secuencia de ADN para IL-1A, IL-1B e IL-1RN puede encontrarse en el sitio web del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando el registro de GenBank n.º X03833, n.º X04500 y n.º X64532 respectivamente. Pueden diseñarse fácilmente cebadores adecuados para la detección de un polimorfismo humano en estos genes usando esta información de secuencia y técnicas convencionales conocidas en la técnica para el diseño y la optimización de secuencias de cebadores. El diseño óptimo de tales secuencias de cebador puede lograrse, por ejemplo, mediante el uso de programas de selección de cebadores comercialmente disponibles tales como Primer 2.1, Primer 3 o GeneFisher (véase también, Nicklin M. H. J., Weith A. Duff G. W., "A Physical Map of the Region Encompassing the Human Interleukin-1 α , interleukin-1 β , and Interleukin-1 Receptor Antagonist Genes" *Genomics* 19: 382 (1995); Nothwang H. G., *et al.* "Molecular Cloning of the Interleukin-1 gene Cluster: Construction of an Integrated YAC/PAC Contig and a partial transcriptional Map in the Region of Chromosome 2q13" *Genomics* 41: 370 (1997); Clark, *et al.* (1986) *Nucl. Acids. Res.*, 14:7897-7914 [aparece una fe de erratas publicada en *Nucleic Acids Res.*, 15:868 (1987) y el proyecto Genome Database (GDB)).

Adicionalmente se dan a conocer kits para realizar los ensayos descritos anteriormente. Los kits pueden incluir medios para determinar si un sujeto porta al menos un alelo que comprende un haplotipo o alelo asociado con OA. El kit también puede contener medios de recogida de muestra de ácido nucleico. El kit también puede contener una muestra de control o bien positiva o bien negativa o un patrón y/o un dispositivo algorítmico para evaluar los resultados y reactivos y componentes adicionales incluyendo: reactivos de amplificación de ADN, ADN polimerasa, reactivos de amplificación de ácido nucleico, enzimas restrictivas, tampones, un dispositivo de toma de muestras de ácido nucleico, dispositivo de purificación de ADN, desoxinucleótidos, oligonucleótidos (por ejemplo sondas y cebadores), etc.

Para su uso en un kit, los oligonucleótidos pueden ser cualquiera de una variedad de composiciones naturales y/o sintéticas tales como oligonucleótidos sintéticos, fragmentos de restricción, ADNc, ácidos nucleicos peptídicos sintéticos (ANP), y similares. El kit y método de ensayo también pueden emplear oligonucleótidos marcados para permitir la facilidad de identificación en los ensayos. Los ejemplos de marcadores que pueden emplearse incluyen radiomarcadores, enzimas, compuestos fluorescentes, estreptavidina, avidina, biotina, restos magnéticos, restos de unión a metales, restos de anticuerpos o antígenos, y similares.

Tal como se describió anteriormente, el control puede ser un control positivo o negativo. Además, la muestra de control puede contener los productos positivos (o negativos) de la técnica de detección de alelo empleada. Por ejemplo, cuando la técnica de detección de alelo es amplificación por PCR, seguida por fraccionamiento por tamaño, la muestra de control puede comprender fragmentos de ADN del tamaño apropiado. Asimismo, cuando la técnica de detección de alelo implica detección de una proteína mutada, la muestra de control puede comprender una muestra de proteína mutada. Sin embargo, se prefiere que la muestra de control comprenda el material que va a someterse a prueba. Por ejemplo, los controles pueden ser una muestra de ADN genómico o una parte clonada de la agrupación génica de IL-1. Sin embargo, preferiblemente la muestra de control es una muestra altamente purificada de ADN genómico cuando la muestra que va a someterse a prueba es ADN genómico.

Los oligonucleótidos presentes en dicho kit pueden usarse para la amplificación de la región de interés o para la hibridación directa de oligonucleótidos específicos de alelo (ASO) con los marcadores en cuestión. Por tanto, los oligonucleótidos pueden o bien flanquear el marcador de interés (tal como se requiere para amplificación por PCR) o bien solaparse directamente con el marcador (tal como en la hibridación por ASO).

La información obtenida usando los ensayos y kits descritos en el presente documento (sola o junto con información sobre otro defecto genético o factor del entorno, que contribuye a la osteoartritis) es útil para determinar si un sujeto asintomático tiene o es probable que desarrolle la enfermedad o el estado particular. Además, la información puede permitir un enfoque más personalizado para prevenir la aparición o progresión de la enfermedad o el estado. Por ejemplo, esta información puede permitirle a un médico recetar más eficazmente una terapia que tratará la base molecular de la enfermedad o el estado.

El kit también puede incluir, opcionalmente, medios de toma de muestras de ADN. Un experto en la técnica conoce bien medios de toma de muestras de ADN y pueden incluir, pero no se limitan a, sustratos, tales como papeles de

5 filtro, AmpliCard™ (University of Sheffield, Sheffield, Inglaterra S10 2JF; Tarlow, J W, *et al.*, J. of Invest. Dermatol. 103:387-389 (1994)) y similares; reactivos de purificación de ADN tales como kits de Nucleon™, tampones de lisis, disoluciones de proteinasa y similares; reactivos de PCR, tales como tampones de reacción 10X, polimerasa termoestable, dNTP, y similares; y medios de detección de alelos tales como la enzima de restricción HinfI, oligonucleótidos específicos de alelo, cebadores oligonucleotídicos degenerados para PCR anidada a partir de sangre seca.

Definiciones

10 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o pruebas de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen métodos y materiales adecuados.

15 En caso de conflicto, primará la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos, no se pretende que sean limitativos. Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

20 Tal como se usa a lo largo de esta divulgación, las formas en singular “un”, “una” y “el/la” incluyen la referencia en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, una referencia a “una composición” incluye una pluralidad de tales composiciones, así como una composición individual, y una referencia a “un agente terapéutico” es una referencia a uno o más agentes terapéuticos y/o farmacéuticos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

25 El término “alelo” se refiere a las diferentes variantes de secuencia encontradas en diferentes regiones polimórficas. Por ejemplo, IL-1RN (VNTR) tiene al menos cinco alelos diferentes. Las variantes de secuencia pueden ser cambios de una única base o de múltiples bases, incluyendo sin limitación inserciones, deleciones o sustituciones, o pueden ser un número variable de repeticiones de secuencia.

30 El término “patrón alélico” se refiere a la identidad de un alelo o alelos en una o más regiones polimórficas. Por ejemplo, un patrón alélico puede consistir en un único alelo en un sitio polimórfico, tal como para el alelo 1 de IL-1RN (VNTR), que es un patrón alélico que tiene al menos una copia del alelo 1 de IL-1 RN en VNTR de los loci génicos de IL-1RN. Alternativamente, un patrón alélico puede consistir en un estado o bien homocigótico o bien heterocigótico en un único sitio polimórfico. Por ejemplo, el alelo 2,2 de IL-1-RN (VNTR) es un patrón alélico en el que hay dos copias del segundo alelo en el marcador VNTR de IL-1RN que corresponde al estado de alelo 2 de IL-RN (VNTR) homocigótico. Alternativamente, un patrón alélico puede consistir en la identidad de alelos en más de un sitio polimórfico.

40 La “actividad biológica” o “bioactividad” o “actividad” o “función biológica”, que se usan de manera intercambiable, para los fines en el presente documento significan una función efectora o antigénica que se realiza directa o indirectamente por un polipéptido de IL-1 (ya sea en su conformación nativa o desnaturalizada), o mediante cualquier subsecuencia de la misma. Las actividades biológicas incluyen unión a un péptido diana, por ejemplo, un receptor de IL-1. Una bioactividad de IL-1 puede modularse afectando directamente a un polipéptido de IL-1. Alternativamente, una bioactividad de IL-1 puede modularse modulando el nivel de un polipéptido de IL-1, tal como modulando la expresión de un gen de IL-1.

50 Tal como se usa en el presente documento el término “fragmento bioactivo de un polipéptido de IL-1” se refiere a un fragmento de un polipéptido de IL-1 de longitud completa, en el que el fragmento imita o antagoniza específicamente la actividad de un polipéptido de IL-1 de tipo natural. El fragmento bioactivo es preferiblemente un fragmento que puede interactuar con un receptor de interleucina.

55 Los términos “control” o “muestra de control” se refieren a cualquier muestra apropiada para la técnica de detección empleada. La muestra de control puede contener los productos de la técnica de detección de alelo empleada o el material que va a someterse a prueba. Además, los controles pueden ser controles positivos o negativos. A modo de ejemplo, cuando la técnica de detección de alelo es amplificación por PCR, seguida por fraccionamiento por tamaño, la muestra de control puede comprender fragmentos de ADN de un tamaño apropiado. Asimismo, cuando la técnica de detección de alelo implica la detección de una proteína mutada, la muestra de control puede comprender una muestra de una proteína mutante. Sin embargo, se prefiere que la muestra de control comprenda el material que va a someterse a prueba. Por ejemplo, los controles pueden ser una muestra de ADN genómico o una parte clonada de la agrupación génica de IL-1. Sin embargo, cuando la muestra que va a someterse a prueba es ADN genómico, la muestra de control es preferiblemente una muestra altamente purificada de ADN genómico.

65 Las expresiones “alteración del gen” y “alteración dirigida” o cualquier expresión similar se refieren a la interrupción específica del sitio de una secuencia de ADN nativa para prevenir la expresión de ese gen en la célula en comparación con la copia de tipo natural del gen. La interrupción puede provocarse mediante deleciones,

inserciones o modificaciones en el gen, o cualquier combinación de las mismas.

Se pretende que el término "haplotipo" tal como se usa en el presente documento se refiera a un conjunto de alelos que se heredan juntos como grupo (están en desequilibrio de ligamiento) a niveles estadísticamente significativos ($P_{corr} < 0,05$). Tal como se usa en el presente documento, la expresión "un haplotipo de IL-1" se refiere a un haplotipo en los loci de IL-1. Un haplotipo proinflamatorio o inflamatorio de IL-1 se refiere a un haplotipo que es indicativo de actividades agonistas aumentadas y/o antagonistas disminuidas.

Los términos "agrupación génica de IL-1" y "loci de IL-1" tal como se usan en el presente documento incluyen todo el ácido nucleico en o cerca de la región 2q13 del cromosoma 2, incluyendo al menos los genes de IL-1A, IL-1B e IL-1RN y cualquier otra secuencia unida (Nicklin *et al.*, Genomics 19: 382-84, 1994). Los términos "IL-1A", "IL-1B" e "IL-1RN" tal como se usan en el presente documento se refieren a los genes que codifican para IL-1 alfa, IL-1 beta y antagonista de receptor de IL-1, respectivamente. El número de registro génico para IL-1A, IL-1B e IL-1RN es X03833, X04500 y X64532, respectivamente.

"Mutación funcional de IL-1" se refiere a una mutación dentro de la agrupación génica de IL-1 que da como resultado un fenotipo alterado (es decir, afecta a la función de un gen o proteína de IL-1). Los ejemplos incluyen: alelo 2 de IL-1A (+4845), alelo 2 de IL-1B (-3737), alelo 2 de IL-1B (+6912), alelo 2 de IL-1B (-31) y alelo 2 de IL-1RN (+2018).

"Alelo Y de IL-1 X (Z)" se refiere a una forma alélica particular, denominada Y, que se produce en un sitio polimórfico de locus de IL-1 en el gen X, en el que X es IL-1 A, B o RN y situada en o cerca del nucleótido Z, en el que el nucleótido Z se numera con respecto al sitio de inicio de la transcripción principal, que es el nucleótido +1, del gen X de IL-1 particular. Tal como se usa adicionalmente en el presente documento, el término "alelo de IL-1 X (Z)" se refiere a todos los alelos de un sitio polimórfico de IL-1 en el gen X situados en o cerca del nucleótido Z. Por ejemplo, el término "alelo de IL-1RN (+2018)" se refiere a formas alternativas del gen de IL-1RN en el marcador +2018. "Alelo 2 de IL-1RN (+2018)" se refiere a una forma del gen de IL-1RN que contiene una citosina (C) en la posición +2018 de la cadena sentido. Clay *et al.*, Hum. Genet. 97:723-26, 1996. "Alelo 1 de IL-1RN (+2018)" se refiere a una forma del gen de IL-1 RN que contiene una timina (T) en la posición +2018 de la cadena positiva. Cuando un sujeto tiene dos alelos de IL-1RN idénticos, se dice que el sujeto es homocigótico, o que tiene el estado homocigótico. Cuando un sujeto tiene dos alelos de IL-1RN diferentes, se dice que el sujeto es heterocigótico, o que tiene el estado heterocigótico. El término "alelo 2,2 de IL-1RN (+2018)" se refiere al estado de alelo 2 de IL-1RN (+2018) homocigótico. A la inversa, el término "alelo 1,1 de IL-1RN (+2018)" se refiere al estado de alelo 1 de IL-1RN (+2018) homocigótico. El término "alelo 1,2 de IL-1RN (+2018)" se refiere al estado de alelo 1 y 2 heterocigótico.

Alternativamente, un alelo se nombra mediante el nucleótido en el sitio polimórfico. Por ejemplo, "alelo T de IL-1RN (+2018)" se refiere a una forma del gen de IL-1 RN que contiene una timina (T) en la posición +2018 de la cadena positiva.

Se pretende que "relacionado con IL-1" tal como se usa en el presente documento incluya todos los genes relacionados con los genes del locus de IL-1 humana en el cromosoma humano 2 (2q 12-14). Estos incluyen genes de IL-1 de la agrupación génica de IL-1 humana ubicados en el cromosoma 2 (2q 13-14) que incluyen: el gen de IL-1 A que codifica para interleucina-1 α , el gen de IL-1B que codifica para interleucina-1 β , y el gen de IL-1RN (o IL-1ra) que codifica para el antagonista de receptor de interleucina-1. Además estos genes relacionados con IL-1 incluyen los genes de receptor de IL-1 humana de tipo I y tipo II ubicados en el cromosoma humano 2 (2q12) y sus homólogos de ratón ubicados en el cromosoma de ratón 1 en la posición 19,5 cM. La interleucina-1 α , la interleucina-1 β y la interleucina-1RN están relacionadas en la medida en que todas se unen a receptores de tipo I de IL-1, sin embargo sólo la interleucina-1 α y la interleucina-1 β son ligandos agonistas que activan receptores de tipo I de IL-1, mientras que la interleucina-1RN es un ligando antagonista que se produce de manera natural. Cuando se usa el término "IL-1" en referencia a un polipéptido o producto génico, se pretende que haga referencia a todos los productos génicos codificados por el locus de interleucina-1 en el cromosoma humano 2 (2q 12-14) y sus correspondientes homólogos de otras especies o variantes funcionales de los mismos. Por tanto, el término IL-1 incluye polipéptidos secretados que fomentan una respuesta inflamatoria, tales como IL-1 a e IL-1 β , así como un polipéptido secretado que antagoniza respuestas inflamatorias, tales como antagonista de receptor de IL-1 y el receptor de tipo II (señuelo) de IL-1.

Un "receptor de IL-1" o "IL-1 R" se refiere a diversos receptores de proteínas unidos a membrana celular que pueden unirse a y/o transducir una señal de un ligando codificado por el locus de IL-1. El término se aplica a cualquiera de las proteínas que pueden unirse a moléculas de interleucina-1 (IL-1) y, en su configuración nativa como proteínas de membrana plasmática de mamífero, supuestamente desempeñan un papel en la transducción de la señal proporcionada por IL-1 a una célula. Tal como se usa en el presente documento, el término incluye análogos de proteínas nativas con actividad de unión a IL-1 o transducción de señal. Los ejemplos incluyen los receptores de IL-1 humano y murino descritos en la patente estadounidense n.º 4.968.607. El término "ácido nucleico de IL-1" se refiere a un ácido nucleico que codifica para una proteína de IL-1.

Se pretende que un "polipéptido de IL-1" y una "proteína de IL-1" abarquen polipéptidos que comprenden la

secuencia de aminoácidos codificada por las secuencias de ADN genómico de IL-1 identificadas por los números de registro de GenBank X03833, X04500 y X64532, o fragmentos de los mismos, y homólogos de los mismos e incluyen polipéptidos agonistas y antagonistas.

5 “Riesgo aumentado” se refiere a una frecuencia de aparición estadísticamente superior de la enfermedad o el estado en un individuo que porta un alelo polimórfico particular en comparación con la frecuencia de aparición de la enfermedad o el estado en un miembro de una población que no porta el alelo polimórfico particular.

10 Se pretende que el término “interaccionar” tal como se usa en el presente documento incluya relaciones o asociaciones detectables (por ejemplo interacciones bioquímicas) entre moléculas, tales como interacciones de naturaleza entre proteína-proteína, proteína-ácido nucleico, ácido nucleico-ácido nucleico y proteína-molécula pequeña o ácido nucleico-molécula pequeña.

15 El término “aislado” tal como se usa en el presente documento con respecto a ácidos nucleicos, tales como ADN o ARN, se refiere a moléculas separadas de otros ADN, o ARN, respectivamente, que están presentes en la fuente natural de la macromolécula. Por ejemplo, preferiblemente un ácido nucleico aislado que codifica para uno de los polipéptidos de IL-1 objeto no incluye más de 10 kilobases (kb) de secuencia de ácido nucleico que flanquea inmediatamente de manera natural el gen de IL-1 en ADN genómico, más preferiblemente no más de 5 kb de tales secuencias de flanqueo que se producen de manera natural, y lo más preferiblemente menos de 1,5 kb de tal secuencia de flanqueo que se produce de manera natural. El término aislado tal como se usa en el presente documento también se refiere a un ácido nucleico o péptido que está sustancialmente libre de material celular, material viral, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza de manera química. Además, se pretende que un “ácido nucleico aislado” incluya fragmentos de ácido nucleico que no se producen de manera natural como fragmentos y no se encontrará en el estado natural. El término “aislado” también se usa en el presente documento para hacer referencia a polipéptidos que se aíslan de otras proteínas celulares y se pretende que abarque polipéptidos tanto purificados como recombinantes.

30 “Desequilibrio de ligamiento” se refiere a la herencia conjunta de dos alelos a frecuencias mayores que lo que se esperarían a partir de las frecuencias de aparición separadas de cada alelo en una población de control dada. La frecuencia de aparición esperada de dos alelos que se heredan de manera independiente es la frecuencia del primer alelo multiplicada por la frecuencia del segundo alelo. Se dice que los alelos que se producen de manera conjunta a las frecuencias esperadas están en “desequilibrio de ligamiento”. Con frecuencia la causa del desequilibrio de ligamiento no queda clara. Puede deberse a la selección de determinadas combinaciones de alelos o a la reciente mezcla de poblaciones genéticamente heterogéneas. Además, en el caso de marcadores que están muy estrechamente ligados a un gen de enfermedad, se espera una asociación de un alelo (o grupo de alelos ligados) con el gen de enfermedad si la mutación de enfermedad se produjo en el pasado reciente, de modo que no ha transcurrido un tiempo suficiente como para alcanzar el equilibrio mediante eventos de recombinación en la región cromosómica específica. Cuando se hace referencia a patrones alélicos que están compuestos por más de un alelo, un primer patrón alélico está en desequilibrio de ligamiento con un segundo patrón alélico si todos los alelos que comprenden el primer patrón alélico están en desequilibrio de ligamiento con al menos uno de los alelos del segundo patrón alélico. Un ejemplo de desequilibrio de ligamiento es el que se produce entre los alelos en los sitios polimórficos de IL-1RN (+2018) e IL-1RN (VNTR). Los dos alelos en IL-1RN (+2018) están en desequilibrio de ligamiento al 100% con los dos alelos más frecuentes de IL-1RN (VNTR), que son el alelo 1 y el alelo 2.

45 El término “marcador” se refiere a una secuencia en el genoma que se sabe que varía entre individuos. Por ejemplo, el gen de IL-1RN tiene un marcador que consiste en un número variable de repeticiones en tándem (VNTR).

50 Un “gen mutado” o “mutación” o “mutación funcional” se refieren a una forma alélica de un gen, que puede alterar el fenotipo de un sujeto que tiene el gen mutado con respecto a un sujeto que no tiene el gen mutado. El fenotipo alterado provocado por una mutación puede corregirse o compensarse mediante determinados agentes. Si un sujeto debe ser homocigótico para esta mutación para tener un fenotipo alterado, se dice que la mutación es recesiva. Si una copia del gen mutado es suficiente para alterar el fenotipo del sujeto, se dice que la mutación es dominante. Si un sujeto tiene una copia del gen mutado y tiene un fenotipo que es intermedio entre el de un sujeto que es homocigótico para el gen de tipo natural y el de un sujeto homocigótico para el gen mutado, se dice que la mutación es codominante.

60 Un “animal no humano” de la invención incluye mamíferos tales como roedores, primates no humanos, ovejas, perros, vacas, cabras, etc., anfibios, tales como miembros del género *Xenopus*, y aves transgénicas (por ejemplo pollos, pájaros, etc.). El término “animal quimérico” se usa en el presente documento para hacer referencia a animales en los que se encuentra el gen recombinante, o en los que el gen recombinante se expresa en algunas, pero no en todas, las células del animal. El término “animal quimérico específico de tejido” indica que uno de los genes de IL-1 recombinantes está presente y/o se expresa o altera en algunos tejidos pero no en otros. El término “mamífero no humano” se refiere a cualquier miembro de la clase *Mammalia*, a excepción de los seres humanos.

65 Tal como se usa en el presente documento, el término “ácido nucleico” se refiere a polinucleótidos u oligonucleótidos

tales como ácido desoxirribonucleico (ADN), y, cuando sea apropiado, ácido ribonucleico (ARN). También debe entenderse que el término incluye, como equivalentes, análogos o bien de ARN o bien de ADN preparados a partir de análogos de nucleótidos (por ejemplo ácidos nucleicos peptídicos) y, según sea aplicable para la realización que esté describiéndose, polinucleótidos monocatenarios (sentido o antisentido) y bicatenarios.

El término "polimorfismo" se refiere a la coexistencia de más de una forma de un gen o parte (por ejemplo, variante alélica) del mismo. Una parte de un gen del que hay al menos dos formas diferentes, es decir, dos secuencias de nucleótidos diferentes, se denomina "región polimórfica de un gen". Una secuencia genética específica en una región polimórfica de un gen es un alelo. Una región polimórfica puede ser un único nucleótido, cuya identidad difiere en diferentes alelos. Una región polimórfica también puede tener varios nucleótidos de longitud.

El término "propensión a enfermedad", también "predisposición" o "susceptibilidad" a enfermedad o cualquier expresión similar, significa que determinados alelos se descubre mediante el presente documento que están asociados con, o predicen, la incidencia en un sujeto de desarrollar una enfermedad particular (por ejemplo una enfermedad vascular). Por tanto, los alelos se representan de manera excesiva en cuanto a la frecuencia en individuos con enfermedad en comparación con individuos sanos. Por tanto, estos alelos pueden usarse para predecir la enfermedad incluso en individuos antes de los síntomas o antes de la enfermedad.

Se pretende que "molécula pequeña" tal como se usa en el presente documento se refiera a una composición que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 5 kD y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 4 kD. Las moléculas pequeñas pueden ser ácidos nucleicos, péptidos, peptidomiméticos, hidratos de carbono, lípidos u otras moléculas orgánicas o inorgánicas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "se hibrida específicamente" o "detecta específicamente" se refiere a la capacidad de una molécula de ácido nucleico para hibridarse con al menos aproximadamente 6 nucleótidos consecutivos de un ácido nucleico de muestra.

"Secuencia reguladora de la transcripción" es un término genérico usado a lo largo de la memoria descriptiva para hacer referencia a secuencias de ADN, tales como señales de iniciación, potenciadores y promotores, que inducen o controlan la transcripción de secuencias que codifican para proteínas con las que están operativamente unidas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "transgén" significa una secuencia de ácido nucleico (que codifica, por ejemplo, para uno de los polipéptidos de IL-1, o un transcrito antisentido de los mismos) que se ha introducido en una célula. Un transgén debe ser parcial o totalmente heterólogo, es decir, foráneo, para la célula o el animal transgénico en el que se introduce, o, es homólogo para un gen endógeno de la célula o el animal transgénico en el que se introduce, pero que se diseña para insertarse, o se inserta, en el genoma del animal de tal manera que se altera el genoma de la célula en la que se inserta (por ejemplo, se inserta en una ubicación que difiere de la del gen natural o su inserción da como resultado una desactivación). Un transgén también puede estar presente en una célula en forma de un episoma. Un transgén puede incluir una o más secuencias reguladoras de la transcripción y cualquier otro ácido nucleico, tal como intrones, que puede ser necesario para la expresión óptima de un ácido nucleico seleccionado.

Se pretende que el término "tratar" tal como se usa en el presente documento abarque curar así como mejorar al menos un síntoma de un estado o enfermedad.

El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico, que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector preferido es un episoma, es decir, un ácido nucleico que puede realizar replicación extracromosómica. Los vectores preferidos son aquellos que pueden realizar replicación y/o expresión autónomas de ácidos nucleicos a los que están unidos. Los vectores que pueden dirigir la expresión de genes a los que están operativamente unidos se denominan en el presente documento "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión útiles en técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de "plásmidos" que se refieren generalmente a bucles de ADN bicatenario circulares que, en su forma de vector, no están unidos al cromosoma. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se usan de manera intercambiable ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Sin embargo, se pretende que la invención incluya otras formas de vectores de expresión tales como para que sirvan para funciones equivalentes y que lleguen a conocerse en la técnica con posterioridad al presente documento.

El término "alelo de tipo natural" se refiere a un alelo de un gen que, cuando está presente en dos copias en un sujeto, da como resultado un fenotipo de tipo natural. Puede haber varios alelos de tipo natural diferentes de un gen específico, dado que determinados cambios de nucleótidos en un gen pueden no afectar al fenotipo de un sujeto que tiene dos copias del gen con los cambios de nucleótido.

Ejemplo 1

Los polimorfismos de IL-1 RN están asociados con la gravedad radiográfica en osteoartritis.

Antecedentes/fin: Sigue habiendo una necesidad de marcadores fiables para predecir qué pacientes con osteoartritis (OA) experimentarán progresión de la enfermedad. Estudios anteriores sugirieron que la inflamación puede ser importante en la patogénesis y progresión de la OA. Se realizó un estudio en sujetos con OA de rodilla para investigar polimorfismos génicos candidatos seleccionados para determinar asociaciones con gravedad radiográfica.

Métodos: Ochenta pacientes con OA, con OA de rodilla de NYUHJD, cumplieron con los criterios de inclusión en este análisis retrospectivo transversal. Se determinó el genotipo de pacientes caucásicos de cualquier sexo, libres de enfermedad crónica, con un diagnóstico radiográfico de OA de rodilla, para determinar polimorfismos de un único nucleótido (SNP). Se dividieron estos sujetos en dos grupos: uno que tenía puntuaciones de índice de rodilla de Kellgren-Lawrence (KL) de uno o dos, y el otro, puntuaciones de KL de tres o cuatro. Se separó un subconjunto con datos disponibles (N=36) mediante anchura del espacio articular (JSW) o bien por encima o bien por debajo de la mediana. Se realizó un análisis estadístico usando la prueba exacta de Fisher y la Chi cuadrado, con regresión logística, ajustando para la edad, sexo e IMC para evaluar asociaciones de gravedad radiográfica con SNP individuales y con haplotipos.

Resultados: Tras el ajuste para la edad, sexo e IMC, SNP de antagonista de receptor de IL1 (IL1RN) individuales estaban fuertemente asociados con gravedad radiográfica de KL y anchura del espacio articular (JSW; tabla 1). Además, se asoció portar o bien una o bien dos copias de un haplotipo que consistía en (ACT): IL1RN rs9005, IL1RN rs419598, IL1RN rs315952 (la frecuencia de haplotipo en este estudio de OA era del 32%) con un riesgo sustancialmente disminuido de gravedad radiográfica (GR de 0,14; IC del 95% de 0,05-0,37), y con aumento de JSW ($3,99 \pm 1,76$ mm frente a $3,16 \pm 1,94$ mm; $p = 0,0056$) en comparación con el 68% restante de la población con OA.

Conclusión: Los SNP de IL1RN están asociados con la gravedad radiográfica en OA, y pueden predecir la posibilidad de gravedad radiográfica y progresión. Estos marcadores genéticos pueden ser útiles para el tratamiento médico de la OA, y también como herramienta que beneficia a sujetos con progresión radiográfica en ensayos clínicos de DMOAD.

Tabla 1. Asociación de SNP con gravedad radiográfica

SNP	Genotipo	Frecuencia	Puntuación de KL >2 (N=80)		JSW < mediana (N=36)	
			p	GR (95% CI)	p	GR (95% CI)
IL1RN rs9005 G>A	GG	55%	<0,0002	6,51 (2,33-18,17)	0,007	14,5 (2,05-103,1)
	AA/AG	45%				
IL1RN rs419598 T>C	TT	65%	0,14	2,05 (0,77-5,41)	0,016	28,7 (1,86-445,0)
	CC/CT	35%				
IL1RN rs315952 T>C	CC/CT	47%	0,015	3,09 (1,22-1,79)	NS	NS
	TT	52%				

Definiciones de genotipos:

IL1RN_rs315952	T/T 1,1 T/C 1,2 C/C 2,2
IL1RN_rs9005	G/G 1,1 G/A 1,2 A/A 2,2
IL1RN +(2018)_rs419598	T/T 1,1 T/C 1,2 C/C 2,2

Pares de haplotipos de IL-1RN:

Símbolo de gen (HGNC)	
IL1RN	Cromosoma 2 Ubicación 2q14.2 Pos en cr 2 113607883(+) ID de dbSNP rs9005 Secuencia ccaccG/Aggctg Cebador en 5' (de 5' a 3') Cebador en 3' (de 5' a 3') Alelo 1 G Alelo 2 A
IL1RN	Cromosoma 2 Ubicación 2q14.2 Pos en cr 2 113603678(+)

	ID de dbSNP	rs419598
	Secuencia	gttgcC/Tggata
	Cebador en 5' (de 5' a 3')	
	Cebador en 3' (de 5' a 3')	
	Alelo 1	T
	Alelo 2	C
IL1RN	Cromosoma	2
	Ubicación	2q14.2
	Pos en cr 2	113606775(+)
	ID de dbSNP	rs315952
	Secuencia	gacagC/Tggccc
	Cebador en 5' (de 5' a 3')	
	Cebador en 3' (de 5' a 3')	
	Alelo 1	T
	Alelo 2	C

Lista de referencias

- 5 1. Loughlin J, Dowling B, Mustafa Z, Chapman K. Association of the interleukin-1 gene cluster on chromosome 2q13 with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46(6):1519-27.
2. Meulenbelt I, Seymour AB, Nieuwland M, Huizinga TW, van Duijn CM, Slagboom PE. Association of the interleukin-1 gene cluster with radiographic signs of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* 2004;50(4):1179-86.
- 10 3. Moos V, Rudwaleit M, Herzog V, Hohlig K, Sieper J, Muller B. Association of genotypes affecting the expression of interleukin-1beta or interleukin-1 receptor antagonist with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43(11):2417-22.
- 15 4. Stern AG, de Carvalho MR, Buck GA, Adler RA, Rao TP, Disler D, *et al.* Association of erosive hand osteoarthritis with a single nucleotide polymorphism on the gene encoding interleukin-1 beta. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11(6):394-402.
- 20 5. Smith AJ, Keen LJ, Billingham MJ, Perry MJ, Elson CJ, Kirwan JR, *et al.* Extended haplotypes and linkage disequilibrium in the IL1R1-IL1A-IL1B-IL1RN gene cluster: association with knee osteoarthritis. *Genes Immun* 2004;5(6):451-60.
7. Moxley G, Han J, Stern AG, Riley BP. Potential influence of IL1B haplotype and IL1A-IL1B-IL1RN extended haplotype on hand osteoarthritis risk. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15(10):1106-12.
- 25 8. Botha-Scheepers SA, Watt I, Slagboom E, de Craen AJ, Meulenbelt I, Rosendaal FR, *et al.* Innate production of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-10 is associated with radiological progression of knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2007.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de detección de la predisposición para el riesgo de progresión de enfermedad grave y estrechamiento del espacio articular de osteoartritis en un sujeto que comprende detectar en el sujeto el genotipo en IL1RN rs9005 G>A;
- 10 en el que la presencia de genotipo G/G indica que el sujeto tiene predisposición a la progresión de enfermedad grave y el estrechamiento del espacio articular y la ausencia de este genotipo indica que el sujeto no tiene predisposición a los mismos; y
- 10 en el que la presencia de genotipo A/A o G/A indica que el sujeto está protegido frente a la progresión a enfermedad grave y el estrechamiento del espacio articular y la ausencia de estos genotipos indica que el sujeto no está protegido frente a los mismos.
- 15 2. Método para seleccionar sujetos con osteoartritis para su inclusión en o exclusión de ensayos clínicos que comprende detectar la predisposición para el riesgo de progresión de enfermedad grave y estrechamiento del espacio articular de osteoartritis en un sujeto según la reivindicación 1 e incluir o excluir a dicho sujeto del ensayo clínico según el riesgo del sujeto y los criterios del ensayo clínico.
- 20 3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha etapa de detección se selecciona del grupo que consiste en: a) hibridación de oligonucleótidos específica de alelo; b) análisis del tamaño; c) secuenciación; d) hibridación; e) digestión con 5' nucleasa; f) polimorfismo de conformación monocatenario; g) hibridación específica de alelo; h) extensión específica de cebador; e i) ensayo de ligación de oligonucleótidos.
- 25 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que antes de, o junto con, la detección, se somete la muestra de ácido nucleico a una etapa de amplificación.
- 30 5. Método según la reivindicación 1, que comprende además proporcionar recomendaciones para el tratamiento médico de la osteoartritis basándose en las necesidades predichas del sujeto a una determinada edad.