

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 808**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

A61B 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2011 PCT/CA2011/050625**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2012 WO2012045176**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2011 E 11830173 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2598875**

54 Título: **Métodos de base biomecánica de diagnóstico de escoliosis**

30 Prioridad:

04.10.2010 US 389348 P

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

14.06.2017

73 Titular/es:

**Chu Sainte-Justine (100.0%)
3175 Côte-Ste-Catherine
Montreal, Quebec H3T 1C5, CA**

72 Inventor/es:

**MOREAU, ALAIN y
WONG, GUORUEY**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 616 808 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de base biomecánica de diagnóstico de escoliosis

5 Declaración respecto a investigación o desarrollo subvencionados por el gobierno federal

N/A.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere al diagnóstico de una predisposición a desarrollar una escoliosis más grave (por ejemplo, escoliosis idiopática del adolescente (EIA)) en un sujeto que tiene escoliosis y a un método para estratificar un sujeto que tiene escoliosis.

15 Antecedentes de la invención

La escoliosis es una afección médica en la que la columna vertebral de una persona está curvada de un lado a otro, y también puede estar girada. Es una curvatura lateral anormal de la columna vertebral. En una radiografía, la columna vertebral de un individuo con una escoliosis típica puede parecer más una "S" o una "C" que una línea recta.

Las deformidades de la columna vertebral y la escoliosis en particular representan el tipo más prevalente de deformidades ortopédicas en niños y adolescentes, mientras que la escoliosis idiopática (EI) representa la forma más común de escoliosis. La etiología de la escoliosis idiopática del adolescente (EIA) no está clara. La EIA afecta principalmente a niñas en número y gravedad pero, a pesar de varios estudios que sugieren una predisposición genética, la forma de herencia sigue siendo incierta (Axenovich TI et al., Am J Med Genet 1999, 86(4): 389-394; Wise CA et al., Spine 2000, 25(18): 2372-2380; Blank RD et al., Lupus 1999, 8(5): 356-360; Giampietro PF et al., Am J Med Genet 1999, 83(3):164-177). Se han postulado varias perspectivas divergentes para definir mejor esta etiología (Machida M., Spine 1999, 24(24): 2576-2583; Roth JA et al., J Biol Chem 1999, 274(31): 22041-22047; Hyatt BA et al., Nature 1996, 384(6604): 62-65; von Gall C et al., Eur J Neurosci 2000, 12(3): 964-972). La genética, la secreción de hormona del crecimiento, la estructura del tejido conectivo, la fuerza muscular, la disfunción vestibular, la secreción de melatonina y la microestructura de plaquetas son áreas de enfoque fundamentales. La actual opinión es que es un defecto del control o procesamiento central por el sistema nervioso central (SNC) que afecta a una columna vertebral en crecimiento y que la susceptibilidad de la columna vertebral a la deformación varía de un individuo a otro.

Desafortunadamente, aún no existe ningún método aprobado por la FDA para identificar niños o adolescentes en riesgo de desarrollar EI para predecir qué individuos afectados requieren tratamiento para prevenir o detener la progresión de la enfermedad (Weinstein SL, Dolan LA, Cheng JC et al. Adolescent idiopathic scoliosis. Lancet 2008; 371: 1527-37). En consecuencia, la aplicación de tratamientos actuales, tales como inmovilización ortopédica o corrección quirúrgica, se retrasa hasta la detección de una deformidad significativa o una demostración de progresión clara, dando como resultado un tratamiento retardado e inferior al óptimo (Society SR. Morbidity & Mortality Committee annual Report 2002-2003). Entre pacientes con EI que requieren tratamiento, del 80 al 90 % serán tratados mediante inmovilización ortopédica y aproximadamente el 1 % necesitarán cirugía para corregir la deformidad mediante instrumentación para la columna vertebral y fusión a la columna vertebral torácica y/o lumbar con el riesgo de tener complicaciones (Weiss HR, Goodall D. Rate of complications in scoliosis surgery - a systematic review of the Pub Med literature. Scoliosis. 2008; 3: 9). Hoy en día en los Estados Unidos, hay aproximadamente un millón de niños entre edades de 10 y 16 años con cierto grado de EI. Uno de cada seis niños diagnosticados con escoliosis tendrá una curva que progresa hasta un grado que requiere tratamiento activo. Aproximadamente 29.000 cirugías de escoliosis se realizan cada año en Norteamérica, dando como resultado morbilidad psicológica y física significativa (Goldberg MS, Mayo NE, Poitras B et al. The Ste-Justine Adolescent Idiopathic Scoliosis Cohort Study. Part I: Description of the study. Spine 1994; 19: 1551-61; Poitras B, Mayo NE, Goldberg MS et al. The Ste-Justine Adolescent Idiopathic Scoliosis Cohort Study. Part IV: Surgical correction and back pain. Spine 1994; 19: 1582-8).

Existe una necesidad de métodos para diagnosticar enfermedades que implican deformidades de columna vertebral (por ejemplo, escoliosis, tal como EIA), para diagnosticar una predisposición a escoliosis y para identificar compuestos para prevenir o tratar estas enfermedades.

60 Sumario de la invención

Los inventores de la presente invención han demostrado que los cambios en los niveles de osteopontina (OPN) (también llamada fosfoproteína 1 secretada, sialoproteína ósea I, activación de linfocitos T temprana 1) inducidos por fuerza mecánica aplicada por el cuerpo son más pronunciados en sujetos de control con respecto a pacientes escolióticos (por ejemplo, pacientes de caso quirúrgico (ángulo de Cobb $\geq 45^\circ$)).

Más específicamente, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un método (por ejemplo, un método *in vitro*) para diagnosticar una predisposición a desarrollar una escoliosis más grave (por ejemplo, una escoliosis idiopática (EI) tal como escoliosis idiopática infantil, escoliosis idiopática juvenil o escoliosis idiopática del adolescente (EIA)) en un futuro en un sujeto que tiene escoliosis, que comprende: (a) medir un primer nivel de osteopontina (OPN) en una muestra biológica proveniente de dicho sujeto; (b) medir un segundo nivel de OPN en una muestra biológica correspondiente proveniente de dicho sujeto, en el que dicha muestra biológica correspondiente se obtiene después de que se ha aplicado un estímulo o fuerza mecánica a una o más partes del cuerpo de dicho sujeto; (c) determinar una variación entre dicho primer nivel de OPN y dicho segundo nivel de OPN; (d) comparar dicha variación con un valor de variación de control; y (e) determinar si dicho sujeto tiene una escoliosis o está predispuesto a desarrollar una escoliosis, basándose en dicha comparación.

En una realización específica, el valor de variación de control corresponde a una variación entre un primer nivel de OPN y un segundo nivel de OPN determinado en muestras biológicas correspondientes provenientes de un sujeto que no tiene una escoliosis o que no es un candidato probable para desarrollar escoliosis. En otra realización específica, una variación inferior determinada en dicho sujeto con respecto a dicho valor de variación de control es indicativa de que dicho sujeto tiene una escoliosis o tiene una predisposición a desarrollar una escoliosis. En otra realización específica, dicha escoliosis es una escoliosis idiopática. En otra realización específica, dicha escoliosis idiopática es escoliosis idiopática del adolescente (EIA). En otra realización específica, dicha muestra biológica es un fluido biológico. En otra realización específica, dicho fluido biológico es una muestra derivada de sangre. En otra realización específica, dicha muestra derivada de sangre es plasma. En otra realización específica, dicha una o más partes del cuerpo es un brazo. En otra realización específica, dicho estímulo o fuerza mecánica es una presión de compresión pulsátil. En otra realización específica, dicha presión de compresión pulsátil se aplica usando una banda hinchable. En otra realización específica, dicha presión de compresión pulsátil se aplica usando un manguito hinchable. En otra realización específica, dicho estímulo o fuerza mecánica se aplica durante un periodo de al menos aproximadamente 15 minutos. En otra realización específica, dicho estímulo o fuerza mecánica se aplica durante un periodo de entre aproximadamente 30 y aproximadamente 90 minutos. En otra realización específica, dicho estímulo o fuerza mecánica se aplica durante un periodo de aproximadamente 90 minutos. En otra realización específica, el sujeto es un candidato probable para desarrollar una escoliosis idiopática del adolescente más grave.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método (por ejemplo, un método *in vitro*) para estratificar un sujeto que tiene una escoliosis (por ejemplo, una escoliosis idiopática (EI) tal como escoliosis idiopática infantil, escoliosis idiopática juvenil o escoliosis idiopática del adolescente (EIA)), comprendiendo dicho método: (a) medir un primer nivel de osteopontina (OPN) en una muestra biológica proveniente de dicho sujeto; (b) medir un segundo nivel de OPN en una muestra biológica correspondiente proveniente de dicho sujeto, en el que dicha muestra biológica correspondiente se obtiene después de que se ha aplicado un estímulo o fuerza mecánica a una o más partes del cuerpo de dicho sujeto; (c) determinar una variación entre dicho primer nivel de OPN y dicho segundo nivel de OPN; (d) comparar dicha variación con un valor de variación de control; y (e) estratificar dicho sujeto, basándose en dicha comparación.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un kit para diagnosticar una predisposición a desarrollar una escoliosis más grave en un futuro en un sujeto que tiene escoliosis, comprendiendo dicho kit: (a) uno o más reactivos para determinar niveles de osteopontina (OPN) en una muestra biológica; (b) instrucciones para diagnosticar una escoliosis o una predisposición a desarrollar una escoliosis en un sujeto; y (c) una banda hinchable o un manguito para el brazo, para aplicar un estímulo o fuerza mecánica sobre una o más partes del cuerpo de dicho sujeto.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un uso de una banda hinchable para diagnosticar una predisposición a desarrollar una escoliosis más grave en un futuro en un sujeto humano que tiene escoliosis.

La escoliosis puede ser escoliosis idiopática, por ejemplo, EIA.

El método de acuerdo con la invención se realiza para diagnosticar una predisposición de un sujeto humano que tiene escoliosis a desarrollar una escoliosis más grave.

En un método descrito en el presente documento, el sujeto puede ser un candidato probable para desarrollar una escoliosis, tal como escoliosis idiopática (por ejemplo, escoliosis idiopática infantil, escoliosis idiopática juvenil o escoliosis idiopática del adolescente (EIA)). Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "candidato probable para desarrollar escoliosis" incluyen sujetos (por ejemplo, niños) de los cuales al menos un progenitor tiene una escoliosis (por ejemplo, escoliosis idiopática del adolescente) (por ejemplo, los sujetos "en riesgo" asintomáticos de la figura 1) y/o que tienen otro pariente que padece escoliosis en más de una generación. Entre otros factores, la edad (adolescencia), el género y otros antecedentes familiares son factores que se sabe que contribuyen al riesgo de desarrollar una escoliosis y se usan en cierto grado para evaluar el riesgo de desarrollar una escoliosis. En ciertos sujetos, la escoliosis se desarrolla rápidamente durante un corto periodo de tiempo hasta el punto de requerir una cirugía correctora (a menudo cuando la deformidad alcanza un ángulo de Cobb $\geq 50^\circ$). Los cursos de acción actuales disponibles desde el momento en que una escoliosis tal como EIA es diagnosticada (cuando la escoliosis

es evidente) incluyen observación (cuando el ángulo de Cobb es de aproximadamente 10-25°), dispositivos ortopédicos (cuando el ángulo de Cobb es de aproximadamente 25-30°), y cirugía (ángulo de Cobb por encima de 45°). Una determinación más fiable del riesgo de progresión podría permitir 1) seleccionar una dieta apropiada para eliminar ciertos productos alimentarios identificados como contribuyentes a escoliosis; 2) seleccionar el mejor agente terapéutico; y/o 3) seleccionar el tratamiento disponible menos invasivo tal como ejercicios posturales, dispositivo ortopédico, o cirugías menos invasivas o cirugías sin fusiones (una cirugía que no fusiona vértebras y preserva la movilidad de la columna). Después del diagnóstico, pueden seleccionarse las acciones o tratamientos preventivos más eficientes y menos invasivos conocidos.

Cualquier muestra biológica (por ejemplo, células, tejidos, fluidos biológicos) en la que se encuentra OPN puede usarse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. La muestra puede ser un fluido biológico tal como orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, o una muestra derivada de sangre tal como sangre, suero o plasma, que son particularmente accesibles y posibilitan un análisis más rápido. En particular, la muestra biológica puede ser plasma. En una realización, la muestra se obtiene o se deriva de un sujeto que tiene una escoliosis idiopática (por ejemplo, escoliosis idiopática infantil, escoliosis idiopática juvenil o escoliosis idiopática del adolescente (EIA)).

En una realización, el valor de variación de control es un valor de variación (correspondiente a la diferencia de los niveles de OPN medidos antes y después de la aplicación de un estímulo o fuerza mecánica) determinado en muestras correspondientes (por ejemplo, una muestra derivada de sangre, tal como plasma) obtenidas o derivadas de un sujeto de control, tal como un sujeto (por ejemplo, de igual edad y/o género) que no ha desarrollado una escoliosis (por ejemplo, escoliosis idiopática tal como escoliosis idiopática infantil, escoliosis idiopática juvenil o escoliosis idiopática del adolescente (EIA)), o que no es un candidato probable para desarrollar escoliosis. Tal como se usan en el presente documento, las expresiones "no un candidato probable para desarrollar una escoliosis" se refieren a la ausencia en el sujeto de factores conocidos que le convierten en un candidato probable para desarrollar escoliosis (por ejemplo, ningún miembro de la familia que tenga escoliosis"). En ese caso, una variación inferior en la muestra proveniente del sujeto con respecto al valor de variación de control correspondiente es indicativa de que el sujeto tiene una escoliosis y/o una predisposición a desarrollar una escoliosis, mientras que una variación superior o sustancialmente idéntica es indicativa de que el sujeto no tiene una predisposición a desarrollar una escoliosis. En una realización, el valor de variación de control es un valor predeterminado derivado de diferencias medidas usando muestras correspondientes provenientes de uno o más sujetos de control (por ejemplo, la variación media o la mediana de la variación, calculada a partir de las diferencias medidas usando muestras provenientes de los sujetos de control).

En una realización, el valor de variación de control mencionado anteriormente corresponde a una variación entre un primer nivel de OPN y un segundo nivel de OPN determinados en muestras biológicas correspondientes provenientes de un sujeto que no tiene una escoliosis o que no es un candidato probable para desarrollar escoliosis, y en el que una variación inferior determinada en dicho sujeto con respecto a dicho valor de variación de control es indicativa de que dicho sujeto tiene una escoliosis o tiene una predisposición a desarrollar una escoliosis.

En otra realización, el valor de variación de control mencionado anteriormente es un valor de variación determinado en muestras correspondientes (por ejemplo, una muestra derivada de sangre, tal como plasma) obtenidas o derivadas de un sujeto de control (por ejemplo, de igual edad y/o género) que ha desarrollado una escoliosis con un ángulo de Cobb <45° (por ejemplo, escoliosis idiopática tal como escoliosis idiopática infantil, escoliosis idiopática juvenil o escoliosis idiopática del adolescente (EIA)), o que es un candidato probable para desarrollar escoliosis con un ángulo de Cobb <45°. En ese caso, una variación inferior o sustancialmente idéntica determinada en las muestras provenientes del sujeto con respecto al valor de variación de control es indicativa de que el sujeto tiene una escoliosis o una predisposición a desarrollar una escoliosis, mientras que una variación superior es indicativa de que el sujeto no tiene una predisposición a desarrollar una escoliosis con un ángulo de Cobb <45°.

En una realización, el valor de variación de control es un valor predeterminado derivado de diferencias medidas usando muestras correspondientes provenientes de uno o más sujetos que han desarrollado una escoliosis con un ángulo de Cobb <45° (por ejemplo, escoliosis idiopática tal como escoliosis idiopática infantil, escoliosis idiopática juvenil o escoliosis idiopática del adolescente (EIA)), o que son candidatos probables para desarrollar escoliosis con un ángulo de Cobb <45° (por ejemplo, el valor medio o mediano calculado a partir de las diferencias medidas usando muestras provenientes de estos sujetos).

En una realización, la muestra correspondiente usada para determinar el valor de variación de control es una muestra del mismo tipo (por ejemplo, las muestras obtenidas antes y después de la aplicación de un estímulo o fuerza mecánica son muestras de plasma) que la proveniente del sujeto. En una realización, la muestra correspondiente usada para medir el segundo nivel de OPN del sujeto es una muestra del mismo tipo (por ejemplo, las muestras obtenidas antes y después de la aplicación de un estímulo o fuerza mecánica son muestras de plasma) que la usada para medir el primer nivel de OPN del sujeto.

En una realización, una variación inferior o superior se refiere a una variación de al menos aproximadamente el 10 %, en realizaciones adicionales al menos aproximadamente el 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 % (2 veces), 150 % o 200 % entre la variación de niveles

de OPN obtenida con las muestras de ensayo/sujeto (muestras obtenidas del sujeto que se está sometiendo a ensayo) con respecto al valor de variación de control. En una realización, una variación sustancialmente idéntica se refiere a una variación que difiere en menos del 10 %, en realizaciones adicionales en menos del 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 % o menos, en comparación con el valor de variación de control.

Los cambios en los niveles de OPN pueden detectarse a niveles de ácido nucleico o polipéptido usando cualesquiera métodos conocidos en la técnica para medir niveles de ácido nucleico o de polipéptido (por ejemplo, detectando un ácido nucleico o polipéptido que comprende una de las secuencias de la figura 3). Los ejemplos no limitantes de métodos para medir niveles de ácido nucleico incluyen reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR), PCR *in situ*, SAGE, PCR cuantitativa (q-PCR), hibridación *in situ*, transferencia de Southern, transferencia de Northern, análisis de secuencia, análisis de micromatrices, detección de un gen informador, u otras plataformas de hibridación de ADN/ARN.

En una realización, los niveles de OPN se miden a niveles de polipéptido, por ejemplo, detectando un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la figura 3. Los ejemplos no limitantes de métodos para medir niveles de polipéptido incluyen transferencia de Western, micromatriz de tejido, inmunotransferencia, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación, resonancia del plasmón superficial, quimioluminiscencia, polarización fluorescente, fosforescencia, análisis inmunohistoquímico, espectrometría de masa por desorción/ionización por láser asistida por matriz acoplada a tiempo de vuelo (MALDI-TOF), microcitometría, microscopía, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), citometría de flujo, y ensayos basados en una propiedad de la proteína incluyendo aunque sin limitarse a unión a ADN, unión a ligando, o interacción con otros socios de proteína.

Anticuerpos específicos para OPN ("anticuerpos anti-OPN"), que pueden usarse para detectar OPN en una muestra biológica en los métodos de la presente invención, se conocen bien en la técnica y están disponibles en el mercado de diversos proveedores tales como Abeam™ (N.º de cat. ab8448, ab14175, ab14176 y ab33046) y ABBIOTEC™ (N.º de cat. 250801). Además, la tabla I a continuación proporciona una lista de kits de ELISA de OPN humana disponibles en el mercado que pueden usarse en los métodos de la presente invención.

Tabla 1: kits de ELISA de OPN humana disponibles en el mercado

KITS DE DETECCIÓN DE OSTEOPONTINA DISPONIBLES EN EL MERCADO			
Compañía	Nombre del kit	Número de catálogo	Sensibilidad
IBL Hambourg	Human Osteopontin ELISA	JP 17158	3,33 ng/ml
IBL America	Human Osteopontin N- Half Assay Kit- IBL	27258	3,90 pmol/l
IBL America	Human Osteopontin Assay Kit- IBL	27158	3,33 ng/ml
Assay Designs	Osteopontin (human) EIA kit	900-142	0,11 ng/ml
American Research Products Inc.	Osteopontin human kit	17158	NA
R & D Systems	Human Osteopontin (OPN) ELISA Kit	DOST00	0,024 ng/ml
Promokine	Human Osteopontin ELISA	PK-EL-KA4231	3,6 ng/ml
USCNK Life Sciences Inc.	ELISA kit for human Osteopontin (OPN)	E90899HU	0,14 ng/ml
BioVendor	Osteopontin (OPN) Human ELISA	BBT0482R	< 50 pg/ml

Pueden usarse anticuerpos tanto monoclonales como policlonales dirigidos a OPN en los métodos de la presente invención. Dichos anticuerpos pueden producirse mediante procedimientos bien establecidos conocidos por los expertos en la materia.

Tal como se usan en el presente documento, las expresiones "anticuerpo anti-OPN" o "anticuerpo anti-OPN inmunológicamente específico" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a (interactúa con) una proteína OPN (por ejemplo, un polipéptido OPN que tiene la secuencia expuesta en la figura 6) y no presenta ninguna unión sustancial a otras proteínas de origen natural diferentes de las que comparten los mismos determinantes antigénicos que la proteína OPN.

El término anticuerpo o inmunoglobulina se usa en el sentido más amplio, y abarca anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos Fab y Fab'), y variantes de anticuerpo tales como anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, siempre que muestren la actividad biológica deseada.

Los fragmentos de anticuerpo comprenden una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente una región de unión a antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, de camélidos), anticuerpos de dominio único NAR de tiburón, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Fragmentos de anticuerpo también puede referirse a moléculas de unión que comprenden CDR o dominios de unión al antígeno que incluyen, aunque sin limitarse a, regiones VH (V_H, V_H-V_H), anticalinas, PepBodies™, fusiones de anticuerpo-epítipo de célula T (*Troybodies*) or *Peptibodies*. Adicionalmente, cualesquiera anticuerpos secundarios, ya sean monoclonales o policlonales, dirigidos a los primeros anticuerpos también estarían incluidos dentro del alcance de esta invención.

En general, técnicas para preparar anticuerpos (que incluyen anticuerpos monoclonales e hibridomas) y para detectar antígenos usando anticuerpos se conocen bien en la técnica (Campbell, 1984, en "Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", Elsevier Science Publisher, Amsterdam, Países Bajos) y en Harlow et al., 1988 (en: Antibody A Laboratory Manual, CSH Laboratories).

Los anticuerpos policlonales se generan preferentemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc), intravenosas (iv) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante (por ejemplo, un polipéptido que tiene una secuencia expuesta en la figura 6 o un fragmento de la misma) con o sin un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante a una proteína que es inmunógena en la especie a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina del suero, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoiil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl₂, o R¹N=C=NR, donde R y R¹ son grupos alquilo diferentes.

Los animales pueden estar inmunizados contra el antígeno, conjugados inmunógenos, o derivados combinando el antígeno o conjugado (por ejemplo, 100 µg para conejos o 5 µg para ratones) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después, los animales reciben un refuerzo con el antígeno o conjugado (por ejemplo, con de 1/5 a 1/10 de la cantidad original usada para inmunizar) en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días más tarde, a los animales se les extrae sangre y el suero se ensaya para el valor cuantitativo de anticuerpo. Los animales siguen recibiendo refuerzos hasta que el valor cuantitativo se estabiliza. Preferentemente, para inmunizaciones con conjugado, el animal recibe un refuerzo con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado a una proteína diferente y/o a través de un agente de reticulación diferente. Los conjugados también pueden prepararse en cultivo de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, agentes de agregación tales como alumbre se usan adecuadamente para intensificar la respuesta inmunitaria.

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando el método del hibridoma descrito en primer lugar por Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975), o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (por ejemplo, patente de Estados Unidos N.º 6.204.023). También pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando las técnicas descritas en las patentes de Estados Unidos N.º 6.025.155 y 6.077.677 así como las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2002/0160970 y 2003/0083293 (véase también, por ejemplo, Lindenbaum et al., 2004).

En el método del hibridoma, un ratón u otros animal huésped apropiado, tal como una rata, hámster o mono, es inmunizado (por ejemplo, tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento) para producir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al antígeno usado para inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Los linfocitos se fusionan a continuación con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tales como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma.

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá

normalmente hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

5 Los métodos pueden realizarse en un formato adecuado para ensayos de alto rendimiento, por ejemplo, formato de 96 o 384 pocillos, y pueden usarse robots e instrumentación adecuados, (por ejemplo, robots de pipeteo).

10 Tal como se usa en el presente documento, estímulo o fuerza mecánica se refiere a una estimulación de una o más partes del cuerpo (por ejemplo, dedo(s), brazo(s), muslo(s), pierna(s), una combinación de cualquiera de las anteriores, etc.) del sujeto a través de medios mecánicos, por ejemplo usando un aparato/dispositivo tal como una máquina isocinética, corsé, placas vibratorias o una banda hinchable (por ejemplo, manguito para muslos o brazos, anillo, etc.), a través del ejercicio físico (por ejemplo, ejercicios estandarizados) o a través de estimulaciones biomecánicas mediante manipulación (por ejemplo, masaje). Los ejemplos de aparatos/dispositivos adecuados para inducir un estímulo o fuerza mecánica se conocen en la técnica e incluyen dispositivos de terapia por masaje con compresión de aire, dispositivos de compresión neumática intermitente, el Air compression therapy system™ (DL-2002D) y el dispositivo de prevención de DVT DVT2600 comercializado por Daesung Maref Co., Ltd.; el Petite Basic System comercializado por Mego Afek AC Ltd, así como los descritos en la publicación de patente de Estados Unidos N.º 20090177127, Galili et al., Thromb Res. 2007 121(1): 37-41. Publicación en línea del 17 de abril de 2007 15 17; Colwell et al., J Bone Joint Surg Am. 2010 92(3): 527-35, las patentes de Estados Unidos N.º 6.905.456 y 6.916.298. Tal como se usa en el presente documento, "una o más partes del cuerpo" se refiere a uno o más 20 dedo(s), brazo(s), muslo(s), pierna(s), una combinación de cualquiera de las anteriores, etc.

25 El estímulo o fuerza mecánica mencionada anteriormente puede ser una presión de compresión pulsátil, por ejemplo una presión de compresión pulsátil de aproximadamente 0-41,36854368 kPa (0-6 psi), o una presión de compresión pulsátil de aproximadamente 0-27,57902912 kPa (0-4 psi). La presión de compresión pulsátil mencionada anteriormente puede aplicarse usando un manguito hinchable. La fuerza o estímulo mecánico mencionado anteriormente puede aplicarse a uno o ambos brazos del sujeto. La fuerza o estímulo mecánico mencionado anteriormente puede aplicarse a un brazo del sujeto y la muestra biológica (por ejemplo, muestra derivada de sangre) se recoge/extrae del brazo opuesto. La muestra biológica correspondiente a partir de la que se mide el segundo nivel de OPN es muestreada durante el estímulo o fuerza mecánica, inmediatamente después del estímulo 30 o fuerza mecánica o poco después de interrumpir la aplicación del estímulo o fuerza mecánica. Se espera que la distancia entre la localización del muestreo y la localización de la aplicación del estímulo o fuerza mecánica no altere significativamente la variación del nivel de OPN dado que OPN es una molécula circulante.

35 La fuerza o estímulo mecánico mencionado anteriormente puede aplicarse durante un periodo de tiempo suficiente para inducir una respuesta de OPN (por ejemplo, para incrementar los niveles de OPN circulante) en un sujeto. En los ejemplos presentados a continuación, la fuerza o estímulo se aplicó sobre un brazo durante 30, 60 y 90 minutos. La duración de 90 minutos se seleccionó como aceptable en un entorno pediátrico, durando otros ensayos pediátricos hasta esa duración. Esta duración se seleccionó, por lo tanto, por razones prácticas (por ejemplo, los progenitores y los niños pueden ser más reacios a someterse al ensayo si éste dura más). Se cree, sin embargo, 40 que la fuerza o estímulo pueden aplicarse durante mucho más de 90 minutos y. La fuerza o estímulo mecánico mencionado anteriormente puede aplicarse por ejemplo durante un periodo de al menos aproximadamente 15 minutos, al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 60 minutos o al menos aproximadamente 90 minutos. En una realización, el estímulo o fuerza mecánica mencionada anteriormente se aplica durante un periodo de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 200 minutos, en una realización 45 adicional durante un periodo de entre aproximadamente 30 y aproximadamente 90 minutos, en una realización adicional durante aproximadamente 90 minutos. El brazo también se seleccionó como parte del cuerpo sobre la que se aplicaría presión por razones prácticas (por ejemplo, manguitos hinchables son un aparato médico común, los progenitores y los niños están habituados a este equipo, etc.). Se creyó que equipos más grandes que podrían usarse para aplicar presión sobre los muslos por ejemplo podrían haber incrementado la ansiedad de los progenitores y los niños y reducir el número de participantes. Se espera que aplicar presión sobre una superficie corporal más grande pueda incrementar la variación del nivel de OPN más rápidamente y reducir el plazo requerido para realizar el ensayo. 50

55 En el presente documento también se describen kits para poner en práctica los métodos mencionados anteriormente. Los kits pueden incluir, por ejemplo, uno o más reactivos para determinar niveles de OPN en una muestra, así como tampones, recipientes, muestras de control (por ejemplo, muestras provenientes de un sujeto que no tiene y que no es un candidato probable para desarrollar escoliosis), etc., para realizar los ensayos del sujeto. Los diversos componentes del kit pueden estar presentes en recipientes independientes o ciertos componentes compatibles pueden combinarse previamente en un único recipiente, según se desee. 60

65 Además de uno o más de los componentes mencionados anteriormente, los kits pueden incluir además normalmente instrucciones para usar los componentes del kit para poner en práctica los métodos descritos en el presente documento (instrucciones para correlacionar los niveles de OPN con un diagnóstico de una escoliosis y/o de una predisposición a desarrollar una escoliosis). Las instrucciones para poner en práctica los métodos se registran en general en un medio de grabación adecuado. Por ejemplo, las instrucciones pueden imprimirse sobre un sustrato, tal como papel o plástico, etc. Por lo tanto, las instrucciones pueden estar presentes en los kits como un

inserto en el envase, en la etiqueta del recipiente del kit o componentes del mismo (es decir, asociadas con el envase o subenvase) etc. Las instrucciones pueden estar presentes como un archivo de datos de almacenamiento electrónico presente en un medio de almacenamiento legible por ordenador adecuado, por ejemplo CD-ROM, disquete, etc. Las instrucciones físicas pueden no estar presentes en el kit, pero pueden proporcionarse medios para obtener las instrucciones a partir de una fuente remota, por ejemplo, a través de internet. Un ejemplo es un kit que incluye una dirección de internet donde se pueden ver las instrucciones y/o a partir de la cual se pueden descargar las instrucciones. Como con las instrucciones, estos medios para obtener las instrucciones están registrados en un sustrato adecuado. Además de uno o más de los componentes mencionados anteriormente, los kits pueden incluir además un dispositivo para aplicar el estímulo o fuerza mecánica (por ejemplo, banda hinchable tal como manguito para el dedo, o manguito hinchable).

Otros objetivos, ventajas y características de la presente invención se volverán más evidentes tras la lectura de la siguiente descripción no restrictiva de realizaciones específicas de la misma, dada a modo de ejemplo solamente con referencia a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos adjuntos:

La figura 1 muestra una visión de conjunto del diseño de los experimentos descritos en el presente documento;

La figura 2 muestra los cambios en los niveles de OPN en sujetos de control (rombos, izquierda), pacientes moderadamente afectados de escoliosis (cuadrados, centro) y sujetos de caso quirúrgico (triángulos, derecha) después de 90 minutos de estimulación mecánica compresiva periódica, 0-27,57902912 kPa (0-4 psi), 0,006 Hz;

La figura 3 muestra los niveles de OPN circulante inicial promedio (media \pm SD) entre subgrupos experimentales antes de la estimulación mecánica. No se descubrió ninguna diferencia significativa entre grupos ($p=0,20$, ANOVA de una vía);

La figura 4 muestra el cambio promedio en los niveles de OPN (media \pm SD) entre subgrupos experimentales después de 90 minutos de estimulación mecánica. Se descubrió una diferencia fuertemente significativa entre grupos ($p=0,003441$, ANOVA de una vía);

La figura 5 muestra el cambio promedio en los niveles de sCD44 (media \pm SD) entre subgrupos experimentales después de 90 minutos de estimulación mecánica. No se descubrió ninguna diferencia significativa entre grupos ($p=0,542$, ANOVA de una vía); y

La figura 6 presenta las secuencias de nucleótidos de las tres isoformas de OPN humana (variante de transcrito 1, ARNm NM_001040058 (SEQ ID NO: 1); variante de transcrito 2, ARNm NM_000582 (SEQ ID NO: 2); variante de transcrito 3, ARNm NM_001040060 (SEQ ID NO: 3) y las secuencias de aminoácidos de las tres isoformas de OPN humana (isoforma a NP_001035147 (SEQ ID NO: 4); isoforma b NP_000573 (SEQ ID NO: 5); e isoforma c NP_001035149 (SEQ ID NO: 6)).

Descripción de realizaciones ilustrativas

La presente invención se ilustra con más detalle mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Se reclutaron veintiún (21) sujetos de ensayo entre las edades de 9-17, cada uno de los cuales estaba en uno de 3 grupos de sujetos: i) casos quirúrgicos (pre-cirugía, ángulo de Cobb $\geq 45^\circ$ ($n=3$), ii) casos moderadamente afectados (ángulo de Cobb $10-44^\circ$) ($n=12$); y iii) controles sanos ($n=6$). Las características clínicas de los sujetos reclutados se presentan en la tabla II a continuación. Una visión de conjunto del diseño experimental se representa en la figura 1 y se describe además con más detalle en el ejemplo 3 a continuación.

TABLA II: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE SUJETOS RECLUTADOS ANTES DEL 4 DE OCTUBRE DE 2010			
ID aleatoria del paciente	Características		
	Género	Edad (Años)	Grupo clínico
1679	Femenino	13	EIA $\geq 45^\circ$
1681	Femenino	13	EIA $\geq 45^\circ$
1680	Femenino	15	EIA $\geq 45^\circ$
827	Femenino	9	EIA 10-44°
793	Femenino	10	EIA 10-44°
844	Femenino	10	EIA 10-44°
832	Masculino	11	EIA 10-44°
865	Femenino	11	EIA 10-44°
853	Femenino	11	EIA 10-44°
850	Femenino	14	EIA 10-44°
847	Femenino	15	EIA 10-44°
785	Masculino	16	EIA 10-44°
851	Femenino	16	EIA 10-44°
864	Femenino	16	EIA 10-44°
849	Masculino	17	EIA 10-44°
4211	Femenino	10	Sujetos de control sanos
4282	Masculino	12	Sujetos de control sanos
4283	Masculino	15	Sujetos de control sanos
4213	Masculino	15	Sujetos de control sanos
4000A	Masculino	9	Sujetos de control sanos
4000B	Masculino	15	Sujetos de control sanos

Se tomó una muestra de sangre inicial de los sujetos para establecer un valor inicial de OPN circulante. Uno de los brazos de cada sujeto se envolvió a continuación con un manguito hinchable de un ABR Therapeutic Massager™, que aplicó una presión de compresión, pulsátil y dinámica de amplitud variable de 0-27,57902912 kPa (0-4 psi) a 0,006 Hz al brazo durante un periodo de 90 minutos. A intervalos de 30 minutos después del comienzo de la aplicación de fuerza, se tomaron muestras de sangre adicionales con el fin de monitorizar los niveles de OPN circulante en sujetos. Los niveles de OPN se midieron usando el kit de ELISA de osteopontina humana de IBL (Hamburgo), N.º de cat. JP 17158.

Usando el paquete de software R, la significación de los cambios de OPN frente al ángulo de Cobb del sujeto se ajustó en primer lugar a un modelo matemático. A continuación, se realizó el ensayo ANOVA para analizar la significación de la relación entre los cambios de OPN frente al grupo de ángulo de Cobb del paciente o sujetos de control sanos. Tal como se recomienda generalmente por la bibliografía, como una etapa final se realizó un ensayo TukeyHSD (*post-hoc*) para realizar una comparación múltiple de medias (con intervalos de confianza del 95 %) por pares entre grupos de ángulo de Cobb y el grupo de control sano.

Ejemplo 2

Resultados

Tal como se muestra en la figura 2, pueden provocarse respuestas de OPN *in vivo* mediante fuerza mecánica aplicada corporalmente. Una diferencia de >2 veces ($p = 0,002082$) se detectó en la respuesta de OPN provocada del promedio del grupo de paciente de control ($n = 6$) frente al del grupo de caso quirúrgico ($n = 3$) después de 90 minutos. Además, la respuesta promedio del grupo moderadamente afectado ($n = 12$) también fue inferior en comparación con la de los controles.

Ejemplo 3

Materiales y métodos

5 Población de estudio

La junta de revisión interna del CHU Sainte-Justine aprobó el estudio. Los progenitores o tutores legales de todos los participantes en el estudio dieron su consentimiento informado por escrito, y los menores su asentimiento. Los sujetos fueron reclutados de entre la población general del paciente de la clínica ortopédica de Sainte-Justine.

10 Entre enero de 2010 y marzo de 2011, un total de 38 sujetos (edad media $13,69 \pm 2,25$) de diversas etnias se reclutaron incluyendo los 21 sujetos enumerados en la tabla II anterior. Se buscaron cuatro clases particulares de pacientes de 9-17 años de edad: i) controles (edad media $13,87 \pm 2,41$) (n=10); ii) sujetos "en riesgo" asintomáticos (n=7) (edad media $13,16 \pm 2,78$); iii) moderadamente afectados (ángulo de Cobb $10-44^\circ$) (edad media $13,43 \pm 2,50$) (n=13); y iv) individuos afectados gravemente (ángulo de Cobb $\geq 45^\circ$) (edad media $14,26 \pm 1,27$) (n=9).

20 Se consideró que una persona estaba afectada si los antecedentes y el examen físico eran coherentes con el diagnóstico de escoliosis idiopática y se descubrió un mínimo de una curvatura de diez grados en el plano coronal con rotación vertebral en radiografía. El ángulo de Cobb, según lo medido en la radiografía determinó a continuación el estado de un paciente como moderada o gravemente afectado. Se reclutaron niños en riesgo asintomáticos y se examinaron en una clínica de cribado temprano especial, definidos como aquellos con una curvatura de menos de 10 grados pero con antecedentes familiares de EIA. Los controles no tenían ningún antecedente familiar de EIA, y una curvatura de la columna vertebral de menos de 10 grados. Los criterios de exclusión de un sujeto de análisis de datos incluían: i) utilización regular de fármacos anticonceptivos; ii) IMC mayor de 35; iii) empleo de cualquier aparato físico externo para ayudar a estabilizar la columna vertebral. Los datos de pacientes y sujetos de control se resumen en la tabla III a continuación.

	Grupo Experimental	Edad en el momento del ensayo	Género	Tipo de curva	Ángulo de Cobb
1	>45°	12,6	F	ITrTIL	30-71-34
2	>45°	13,8	F		
3	>45°	13,6	F		
4	>45°	13,6	F	rTIL	57-44
5	>45°	13,8	F	ITL	54
6	>45°	13,7	F	ITrTIL	32-51-24
7	>45°	15,3	F		
8	>45°	15	F		
9	>45°	16,9	M	rTITL	39-59
10	10-44	9,5	F	rT	11
11	10-44°	10,9	F	rTIL	36-40
12	10-44°	12	F	rT	16
13	10-44°	11,7	F	ITrT	23-25
14	10-44°	11	F	ITL	11
15	10-44°	11,6	M	rTIL	18-14
16	10-44°	13,7	F	ITL	16
17	10-44°	13,8	F	rTITL	43-24
18	10-44°	14,7	F	ITL	16
19	10-44°	16,3	F	rTIL	16-16
20	10-44°	16,3	M		

TABLA III. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE SUJETOS RECLUTADOS ANTES DEL 22 DE SEPTIEMBRE DE 2011					
	Grupo Experimental	Edad en el momento del ensayo	Género	Tipo de curva	Ángulo de Cobb
21	10-44°	16,2	M	rTL	35
22	10-44°	17	M	rTIL	21-30
23	Asintomático	9,4	M	ITL	12
24	Asintomático	10,8	F	rTIL	5-6'
25	Asintomático	11,5	M	N/A	0
26	Asintomático	12,8	F	rTITL	8-8
27	Asintomático	15,2	F	rTIL	4-4
28	Asintomático	15,4	M	rL	6
29	Asintomático	17	F	N/A	N/A
30	CTRL	10,8	F	N/A	N/A
31	CTRL	12,8	M	N/A	N/A
32	CTRL	13	F	N/A	N/A
33	CTRL	15	F	N/A	N/A
34	CTRL	15,7	M	N/A	N/A
35	CTRL	15,9	M	N/A	N/A
36	CTRL	15,5	M	N/A	N/A
37	CTRL	16	F	N/A	N/A
38	CTRL	9	M	N/A	N/A
39	CTRL	15	M	N/A	N/A

Código del tipo de curva: r = derecha; l = izquierda; T = torácica; L = lumbar; TL = toracolumbar; N/A = no disponible. Sujetos 9 afectados gravemente (edad media $14,26 \pm 1,27$), 13 moderadamente afectados (edad media $13,43 \pm 2,50$), 7 asintomáticos (edad media $13,16 \pm 2,78$), y 10 de control (edad media $13,87 \pm 2,41$).

Estimulación con fuerza mecánica

5 Tras la llegada, a los participantes en el estudio se les pidió que se tumbaran en una cama de hospital. Después de permitir que el paciente se acomodara y descansara sobre la cama durante 5-10 minutos, se extrajo una muestra de sangre inicial de uno de los brazos del paciente.

10 Posteriormente, un par de vejigas neumáticas de tamaño medio de un dispositivo ABR Therapeutic Air Massager (Panacis Medical, Ottawa, Ontario) se dispusieron y se fijaron al otro brazo, de una manera muy similar a como lo haría un esfigmomanómetro, tal como se describe en la documentación del producto. Este dispositivo ABR ha sido certificado por numerosas agencias sanitarias y reguladoras en Norteamérica, la UE, y en todo el mundo, incluyendo una autorización de la agencia sanitaria canadiense (*Health Canada*) para uso clínico en pacientes. El dispositivo masajeador se reprogramó a partir de los ajustes preestablecidos del fabricante con el fin de producir ciclos de hinchado/deshinchado de las vejigas a una frecuencia de aproximadamente 0,006 Hz, suministrar una tensión de compresión pulsátil que variaba entre 0-27,57902912 kPa (0-4 psi) a la zona del brazo cubierta por las vejigas neumáticas de tamaño medio. Los pacientes experimentaron la estimulación durante un total de 90 minutos, tiempo durante el cual se tomaron muestras de sangre del brazo no estimulado, cada treinta minutos, haciendo un total de cuatro muestras de sangre (aproximadamente 5-6 ml cada una) extraídas por paciente, incluyendo la inicial a t=0 min.

20 *Ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima de OPN y sCD44*

Se obtuvieron muestras de sangre de pacientes de EIA, niños en riesgo, asintomáticos y sujetos de control sanos con el fin de determinar los niveles plasmáticos de OPN y sCD44. Éstas se recogieron en tubos tratados con EDTA y

a continuación se centrifugaron. Las muestras de plasma derivadas se dividieron en partes alícuotas y se guardaron congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se descongelaron y se analizaron. Las concentraciones plasmáticas de OPN y sCD44std (isoforma estándar) se midieron mediante ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas de captura (ELISA) de acuerdo con protocolos suministrados por el fabricante (IBL, Hamburgo, Alemania). El kit de ELISA para OPN mide la concentración total de formas tanto fosforiladas como no fosforiladas de OPN en plasma mientras que el kit de ELISA para sCD44std detecta todas las isoformas de CD44 circulante. Todos los ensayos de ELISA se realizaron por duplicado y la densidad óptica se midió a 450 nm usando un lector de microplacas AsysHiTech™ Expert-96 (Biochrom, Cambridge, Reino Unido).

10 *Análisis estadístico*

Los niveles de grupo promedio de OPN y sCD44 se presentan como la media \pm SD. Los valores p de significación estadística de diferencias en niveles de grupo de OPN y sCD44 entre pacientes de control, asintomáticos, moderadamente afectados, y gravemente afectados se evaluaron respectivamente en primera instancia usando modelos de regresión lineal con un ANOVA de una vía. Los efectos de la edad y el género se estudiaron individualmente a continuación, cada uno en combinación con agrupamiento, usando una ANOVA de dos vías con medias ponderadas y sumas de Tipo I de cuadrados para explicar tamaños de muestra desequilibrados (es decir edad y grupo, seguidos por género y grupo como factores en los análisis), donde se definieron grupos de edad para análisis de ANOVA como sujetos más jóvenes entre 9-12 años de edad y aquellos entre 13-17 años. Se compararon factores ambientales del paciente entre grupos experimentales con el test exacto de Fisher para variables discretas y de nuevo *post-hoc* para cualesquiera factores identificados como significativos, y un ANOVA de una vía para variables continuas (edad promedio en cada grupo). Los valores $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. El software usado para todos los cálculos estadísticos era R, versión 2.13.1 (Team, R.D.C., *R: A language and environment for statistical computing, versión 2.13.1*, 2011, R Foundation for Statistical Computing Vienna: Viena, Austria.).

Ejemplo 4

Resultados

Niveles de OPN y sCD44 circulantes

No se descubrió que los valores de partida iniciales de niveles de OPN circulante en sangre fueran significativamente diferentes entre grupos experimentales (ANOVA de una vía $p=0,20$), tal como se muestra en la figura 3. Los niveles promedio de OPN circulante de los 4 grupos experimentales aumentaban en el transcurso de los 90 minutos de estimulación mecánica. Un diagrama de caja en bruto de la variación del nivel de OPN del sujeto por grupo experimental se muestra en la figura 4. Curiosamente, se descubrió una tendencia, que el agrupamiento de pacientes y la variación del nivel de OPN estaban correlacionados de forma fuertemente significativa (ANOVA de una vía $p=0,003441$), con la variación del nivel de OPN promedio por grupo disminuyendo a medida que la gravedad de curva del grupo aumenta. El test HSD *post-hoc* de Tukey mostraba que había una variación muy significativa estadísticamente entre el grupo afectado gravemente y el control ($p=0,0029$), pero no entre otras combinaciones de grupos por parejas, aunque había una correlación en el límite de la significación estadística sugerida entre grupos moderada y gravemente afectados ($p=0,084$) así como entre los grupos de control y asintomático ($p=0,0593$). Se observó una homogeneidad relativa dentro de cada grupo experimental en términos de la variación del nivel de OPN, tal como se pone de manifiesto mediante las desviaciones estándar razonables en cada uno, y la ausencia de ningún valor extremo particularmente marcado.

No se observó ninguna correlación estadísticamente significativa entre agrupamiento de pacientes y la variación del nivel de sCD44 ($p=0,542$), tal como se muestra en la figura 5.

Efectos de la edad y el género

Para estudiar si la variación del nivel de OPN (ΔOPN) estaba afectada por la edad y el sexo de los sujetos, se llevaron a cabo análisis de ANOVA de dos vías con tamaños de muestra desequilibrados y sumas de cuadrados de Tipo I, en primer lugar con género y el grupo experimental como factores. Usando esta construcción modelo, se descubrió que el género tenía un efecto estadísticamente significativo sobre ΔOPN , junto con el grupo experimental (p del género = 0,004664, p del grupo experimental = 0,002664, con el género como el primer factor). Los datos se analizaron a continuación con el orden de los factores invertido, y se descubrió que el género seguía teniendo un efecto estadísticamente significativo sobre ΔOPN , junto con el grupo experimental (p del género = 0,0215275, p del grupo experimental = 0,0009763, con el grupo experimental como el primer factor). Se descubrió una interacción estadísticamente significativa entre el género y el grupo experimental (p de la interacción = 0,028523). En contraste, el agrupamiento por edad era estadísticamente significativo, junto con el grupo experimental, cuando el grupo de edad se consideró como el primer factor (p del grupo de edad = 0,028624, p del grupo experimental = 0,006385), pero solo en el límite de la significación estadística cuando se consideró como el segundo (p del grupo de edad = 0,052138, p del grupo experimental = 0,004397), sin ninguna interacción significativa entre los dos factores (p de la interacción = 0,793477).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> CHU Sainte-Justine
Moreau, Alain
Wong, Guoruey
- <120> MÉTODOS DE BASE BIOMECÁNICA DE DIAGNÓSTICO DE ESCOLIOSIS
- 10 <130> 765/14033.97
- <140> PCT/CA2011/*
<141> 04-10-2011
- 15 <150> US 61/389.348
<151> 04-10-2010
- <160> 6
- 20 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
<211> 1641
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
- 25 <400> 1

ES 2 616 808 T3

ctccctgtgt tgggtggagga tgtctgcagc agcatttaaa ttctgggagg gcttggttgt 60
cagcagcagc aggaggaggc agagcacagc atcgtcggga ccagactcgt ctcaggccag 120
ttgcagcctt ctacagccaaa cgccgaccaa ggaaaactca ctaccatgag aattgcagtg 180
atgtgctttt gcctcctagg catcacctgt gccataccag ttaaacaggc tgattctgga 240
agttctgagg aaaagcagct ttacaacaaa taccagatg ctgtggccac atggctaaac 300
cctgacccat ctcagaagca gaatctccta gcccacaga atgctgtgtc ctctgaagaa 360
accaatgact ttaacaaga gacccttcca agtaagtcca acgaaagcca tgaccacatg 420
gatgatatgg atgatgaaga tgatgatgac catgtggaca gccaggactc cattgactcg 480
aacgactctg atgatgtaga tgacactgat gattctcacc agtctgatga gtctcaccat 540
tctgatgaat ctgatgaact ggtcactgat tttcccacgg acctgccagc aaccgaagtt 600
ttcactccag ttgtccccac agtagacaca tatgatggcc gaggtgatag tgtggtttat 660
ggactgaggt caaaatctaa gaagtttcgc agacctgaca tccagtacc tgatgctaca 720
gacgaggaca tcacctcaca catggaaagc gaggagttga atggtgcata caaggccatc 780
cccgttgccc aggacctgaa cgcgccttct gattgggaca gccgtgggaa ggacagttat 840
gaaacgagtc agctggatga ccagagtgtc gaaaccaca gccacaagca gtccagatta 900
tataagcgga aagccaatga tgagagcaat gagcattccg atgtgattga tagtcaggaa 960
ctttccaaag tcagccgtga attccacagc catgaatttc acagccatga agatatgctg 1020
gttgtagacc ccaaaagtaa ggaagaagat aaacacctga aatttcgtat ttctcatgaa 1080
ttagatagtg catcttctga ggtcaattaa aaggagaaaa aatacaattt ctcactttgc 1140

athtagtaa aagaaaaaat gctttatagc aaaatgaaag agaacatgaa atgcttcttt 1200
ctcagtttat tggttgaatg tgtatctatt tgagtctgga aataactaat gtgtttgata 1260
attagtttag tttgtggctt catggaaact ccctgtaaac taaaagcttc agggttatgt 1320
ctatgttcat tctatagaag aatgcaaac tatcactgta ttttaattatt tgttattctc 1380
tcatgaatag aaatttatgt agaagcaaac aaaatacttt taccactta aaaagagaat 1440
ataacathtt atgtcactat aatcttttgt tttttaagtt agtgtatatt ttgttggat 1500
tatctttttg tgggtggaat aaatctttta tcttgaatgt aataagaatt tgggtggtgc 1560
aattgcttat ttgttttccc acggttgtcc agcaattaat aaaacataac cttttttact 1620
gcctaaaaaa aaaaaaaaaa a 1641

5
<210> 2
<211> 1616
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 616 808 T3

ctccctgtgt	tggtggagga	tgtctgcagc	agcatttaaa	ttctgggag	gcttggtgt	60
cagcagcagc	aggaggaggc	agagcacagc	atcgtcggga	ccagactcgt	ctcaggccag	120
ttgcagcctt	ctcagccaaa	cgccgaccaa	ggaaaactca	ctacatgag	aattgcagt	180
atttgctttt	gcctcctagg	catcacctgt	gccataccag	ttaaacaggc	tgattctgga	240
agttctgagg	aaaagcagct	ttacaacaaa	taccagatg	ctgtggccac	atggctaaac	300
cctgacccat	ctcagaagca	gaatctccta	gccccacaga	cccttccaag	taagtccaac	360
gaaagccatg	accacatgga	tgatatggat	gatgaagatg	atgatgacca	tgtggacagc	420
caggactcca	ttgactcgaa	cgactctgat	gatgtagatg	acactgatga	ttctcaccag	480
tctgatgagt	ctcaccattc	tgatgaatct	gatgaactgg	tactgattt	tcccacggac	540
ctgccagcaa	ccgaagtttt	cactccagtt	gtccccacag	tagacacata	tgatggccga	600
ggtgatagtg	tggtttatgg	actgaggtca	aatctaaga	agtttcgag	acctgacatc	660
cagtaccctg	atgctacaga	cgaggacatc	acctcacaca	tggaaagcga	ggagttgaat	720
ggtgcataca	aggccatccc	cgttgcccag	gacctgaacg	cgcttctga	ttgggacagc	780
cgtgggaagc	acagttatga	aacgagtcag	ctggatgacc	agagtgctga	aaccacagc	840
cacaagcagt	ccagattata	taagcggaaa	gccaatgatg	agagcaatga	gcattccgat	900
gtgattgata	gtcaggaact	ttccaaagtc	agccgtgaat	tccacagcca	tgaatttcac	960
agccatgaag	atatgctggt	tgtagacccc	aaaagtaagg	aagaagataa	acacctgaaa	1020
tttcgtattt	ctcatgaatt	agatagtgca	tcttctgagg	tcaattaaaa	ggagaaaaaa	1080
tacaattttc	cactttgcat	ttagtcaaaa	gaaaaaatgc	tttatagcaa	aatgaaagag	1140
aacatgaaat	gcttctttct	cagtttattg	gttgaatgtg	tatctatttg	agtctggaaa	1200
taactaatgt	gtttgataat	tagtttagtt	tgtggcttca	tggaaactcc	ctgtaaaacta	1260
aaagcttcag	ggttatgtct	atgttcattc	tatagaagaa	atgcaaaacta	tcactgtatt	1320
ttaatatttg	ttattctctc	atgaatagaa	atztatgtag	aagcaaacaa	aatactttta	1380
cccacttaaa	aagagaatat	aacattttat	gtcactataa	tcttttgttt	tttaagttag	1440
tgtatatttt	gttgtgatta	tctttttgtg	gtgtgaataa	atcttttatc	ttgaatgtaa	1500
taagaatttg	gtggtgtcaa	ttgcttattt	gttttccac	ggttgtccag	caattaataa	1560
aacataacct	tttttactgc	ctaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaa	1616

<210> 3
 <211> 1560
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

ES 2 616 808 T3

ctccctgtgt tgggtggagga tgtctgcagc agcatttaaa ttctgggagg gcttggttgt 60
cagcagcagc aggaggaggc agagcacagc atcgtcggga ccagactcgt ctcaggccag 120
ttgcagcctt ctacgcaaaa cgcogaccaa ggaaaactca ctacatgag aattgcagt 180
atttgctttt gcctcctagg catcacctgt gccataccag ttaaacaggc tgattctgga 240
agttctgagg aaaagcagaa tgctgtgtcc tctgaagaaa ccaatgactt taaacaagag 300
acccttccaa gtaagtccaa cgaaagccat gaccacatgg atgatatgga tgatgaagat 360
gatgatgacc atgtggacag ccaggactcc attgactcga acgactctga tgatgtagat 420
gacactgatg attctcacca gtctgatgag tctcaccatt ctgatgaatc tgatgaactg 480
gtcactgatt ttcccacgga cctgccagca accgaagttt tcaactccagt tgtccccaca 540
gtagacacat atgatggccg aggtgatagt gtgggtttatg gactgaggtc aaaatctaag 600
aagtttcgca gacctgacat ccagtaccct gatgctacag acgaggacat cacctcacac 660
atgaaagcg aggagttgaa tgggtcatac aaggccatcc ccgttgccca ggacctgaac 720
gcgcttctg attgggacag cctggggaag gacagttatg aaacgagtca gctggatgac 780
cagagtgtctg aaaccacag ccacaagcag tccagattat ataagcggaa agccaatgat 840
gagagcaatg agcattccga tgtgattgat agtcaggaac tttccaaagt cagccgtgaa 900
ttccacagcc atgaatttca cagccatgaa gatatgctgg ttgtagacc caaaagtaag 960
gaagaagata aacacctgaa atttcgtatt tctcatgaat tagatagtgc atcttctgag 1020
gtcaattaaa aggagaaaaa atacaatttc tcaactttgca tttagtcaaa agaaaaaatg 1080
ctttatagca aatgaaaga gaacatgaaa tgcttctttc tcagtttatt ggttgaatgt 1140
gtatctattht gagtctgga atactaatg tgtttgataa ttagtttagt ttgtggcttc 1200
atgaaaactc cctgtaaact aaaagcttca gggttatgtc tatgttcatt ctatagaaga 1260
aatgcaaaact atcactgtat tttaatattht gttattctct catgaataga aatttatgta 1320
gaagcaaaaca aaatacttht acccacttaa aaagagaata taacatttta tgcactata 1380
atctthtgtt thttaaagta gtgtatattht tgttgatgatt atctthttht ggtgtgaata 1440
aatctthttht ctggaatgta atagaattht ggtggtgtca attgcttatt tgtthtccca 1500
cggttgtcca gcaattaata aaacataacc thtthtactg ctaaaaaaa aaaaaaaaaa 1560

<210> 4
<211> 314
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 4

5

ES 2 616 808 T3

Met Arg Ile Ala Val Ile Cys Phe Cys Leu Leu Gly Ile Thr Cys Ala
1 5 10 15

Ile Pro Val Lys Gln Ala Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Gln Leu
20 25 30

Tyr Asn Lys Tyr Pro Asp Ala Val Ala Thr Trp Leu Asn Pro Asp Pro
35 40 45

Ser Gln Lys Gln Asn Leu Leu Ala Pro Gln Asn Ala Val Ser Ser Glu
50 55 60

Glu Thr Asn Asp Phe Lys Gln Glu Thr Leu Pro Ser Lys Ser Asn Glu
65 70 75 80

Ser His Asp His Met Asp Asp Met Asp Asp Glu Asp Asp Asp Asp His
85 90 95

Val Asp Ser Gln Asp Ser Ile Asp Ser Asn Asp Ser Asp Asp Val Asp
100 105 110

Asp Thr Asp Asp Ser His Gln Ser Asp Glu Ser His His Ser Asp Glu
115 120 125

Ser Asp Glu Leu Val Thr Asp Phe Pro Thr Asp Leu Pro Ala Thr Glu
130 135 140

Val Phe Thr Pro Val Val Pro Thr Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly
145 150 155 160

Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Ser Lys Ser Lys Lys Phe Arg Arg
165 170 175

ES 2 616 808 T3

Pro Asp Ile Gln Tyr Pro Asp Ala Thr Asp Glu Asp Ile Thr Ser His
 180 185 190

Met Glu Ser Glu Glu Leu Asn Gly Ala Tyr Lys Ala Ile Pro Val Ala
 195 200 205

Gln Asp Leu Asn Ala Pro Ser Asp Trp Asp Ser Arg Gly Lys Asp Ser
 210 215 220

Tyr Glu Thr Ser Gln Leu Asp Asp Gln Ser Ala Glu Thr His Ser His
 225 230 235 240

Lys Gln Ser Arg Leu Tyr Lys Arg Lys Ala Asn Asp Glu Ser Asn Glu
 245 250 255

His Ser Asp Val Ile Asp Ser Gln Glu Leu Ser Lys Val Ser Arg Glu
 260 265 270

Phe His Ser His Glu Phe His Ser His Glu Asp Met Leu Val Val Asp
 275 280 285

Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu Lys Phe Arg Ile Ser His
 290 295 300

Glu Leu Asp Ser Ala Ser Ser Glu Val Asn
 305 310

<210> 5
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 5

Met Arg Ile Ala Val Ile Cys Phe Cys Leu Leu Gly Ile Thr Cys Ala
 1 5 10 15

Ile Pro Val Lys Gln Ala Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Gln Leu
 20 25 30

Tyr Asn Lys Tyr Pro Asp Ala Val Ala Thr Trp Leu Asn Pro Asp Pro
 35 40 45

Ser Gln Lys Gln Asn Leu Leu Ala Pro Gln Thr Leu Pro Ser Lys Ser
 50 55 60

Asn Glu Ser His Asp His Met Asp Asp Met Asp Asp Glu Asp Asp Asp
 65 70 75 80

10

ES 2 616 808 T3

Asp His Val Asp Ser Gln Asp Ser Ile Asp Ser Asn Asp Ser Asp Asp
85 90 95

Val Asp Asp Thr Asp Asp Ser His Gln Ser Asp Glu Ser His His Ser
100 105 110

Asp Glu Ser Asp Glu Leu Val Thr Asp Phe Pro Thr Asp Leu Pro Ala
115 120 125

Thr Glu Val Phe Thr Pro Val Val Pro Thr Val Asp Thr Tyr Asp Gly
130 135 140

Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Ser Lys Ser Lys Lys Phe
145 150 155 160

Arg Arg Pro Asp Ile Gln Tyr Pro Asp Ala Thr Asp Glu Asp Ile Thr
165 170 175

Ser His Met Glu Ser Glu Glu Leu Asn Gly Ala Tyr Lys Ala Ile Pro
180 185 190

Val Ala Gln Asp Leu Asn Ala Pro Ser Asp Trp Asp Ser Arg Gly Lys
195 200 205

Asp Ser Tyr Glu Thr Ser Gln Leu Asp Asp Gln Ser Ala Glu Thr His
210 215 220

Ser His Lys Gln Ser Arg Leu Tyr Lys Arg Lys Ala Asn Asp Glu Ser
225 230 235 240

Asn Glu His Ser Asp Val Ile Asp Ser Gln Glu Leu Ser Lys Val Ser
245 250 255

Arg Glu Phe His Ser His Glu Phe His Ser His Glu Asp Met Leu Val
260 265 270

Val Asp Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu Lys Phe Arg Ile
275 280 285

Ser His Glu Leu Asp Ser Ala Ser Ser Glu Val Asn
290 295 300

<210> 6
<211> 287
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 6

ES 2 616 808 T3

Met Arg Ile Ala Val Ile Cys Phe Cys Leu Leu Gly Ile Thr Cys Ala
1 5 10 15

Ile Pro Val Lys Gln Ala Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Gln Asn
20 25 30

Ala Val Ser Ser Glu Glu Thr Asn Asp Phe Lys Gln Glu Thr Leu Pro
35 40 45

Ser Lys Ser Asn Glu Ser His Asp His Met Asp Asp Met Asp Asp Glu
50 55 60

Asp Asp Asp Asp His Val Asp Ser Gln Asp Ser Ile Asp Ser Asn Asp
65 70 75 80

Ser Asp Asp Val Asp Asp Thr Asp Asp Ser His Gln Ser Asp Glu Ser
85 90 95

His His Ser Asp Glu Ser Asp Glu Leu Val Thr Asp Phe Pro Thr Asp
100 105 110

Leu Pro Ala Thr Glu Val Phe Thr Pro Val Val Pro Thr Val Asp Thr
115 120 125

Tyr Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Ser Lys Ser
130 135 140

Lys Lys Phe Arg Arg Pro Asp Ile Gln Tyr Pro Asp Ala Thr Asp Glu
145 150 155 160

Asp Ile Thr Ser His Met Glu Ser Glu Glu Leu Asn Gly Ala Tyr Lys
165 170 175

Ala Ile Pro Val Ala Gln Asp Leu Asn Ala Pro Ser Asp Trp Asp Ser
180 185 190

Arg Gly Lys Asp Ser Tyr Glu Thr Ser Gln Leu Asp Asp Gln Ser Ala
195 200 205

Glu Thr His Ser His Lys Gln Ser Arg Leu Tyr Lys Arg Lys Ala Asn
210 215 220

Asp Glu Ser Asn Glu His Ser Asp Val Ile Asp Ser Gln Glu Leu Ser
225 230 235 240

Lys Val Ser Arg Glu Phe His Ser His Glu Phe His Ser His Glu Asp

ES 2 616 808 T3

245

250

255

Met Leu Val Val Asp Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu Lys
260 265 270

Phe Arg Ile Ser His Glu Leu Asp Ser Ala Ser Ser Glu Val Asn
275 280 285

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para diagnosticar una predisposición a desarrollar una escoliosis más grave en un futuro en un sujeto que tiene una escoliosis, comprendiendo dicho método:
- (a) medir un primer nivel de osteopontina (OPN) en una muestra biológica proveniente de dicho sujeto;
 - (b) medir un segundo nivel de OPN en una muestra biológica correspondiente proveniente de dicho sujeto, en el que dicha muestra biológica correspondiente se obtiene después de que se ha aplicado un estímulo o fuerza mecánica a una o más partes del cuerpo de dicho sujeto;
 - 10 (c) determinar una variación entre dicho primer nivel de OPN y dicho segundo nivel de OPN;
 - (d) comparar dicha variación con un valor de variación de control; y
 - (e) determinar si dicho sujeto está predispuesto a desarrollar una escoliosis más grave en un futuro, basándose en dicha comparación.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho valor de variación de control corresponde a una variación entre un primer nivel de OPN y un segundo nivel de OPN determinado en muestras biológicas correspondientes provenientes de un sujeto que no tiene una escoliosis o que no es un candidato probable para desarrollar escoliosis.
- 20 3. El método de la reivindicación 2, en el que una variación inferior determinada en dicho sujeto con respecto a dicho valor de variación de control es indicativa de que dicho sujeto tiene una predisposición a desarrollar una escoliosis.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha escoliosis es una escoliosis idiopática, preferentemente escoliosis idiopática del adolescente (EIA).
- 25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha muestra biológica es un fluido biológico, preferentemente una muestra derivada de sangre, más preferentemente plasma.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha una o más partes del cuerpo es un brazo.
- 30 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho estímulo o fuerza mecánica es una presión de compresión pulsátil.
8. El método de la reivindicación 7, en el que dicha presión de compresión pulsátil se aplica usando una banda hinchable.
- 35 9. El método de la reivindicación 7, en el que dicha presión de compresión pulsátil se aplica usando un manguito hinchable.
- 40 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho estímulo o fuerza mecánica se aplica durante un periodo de al menos 15 minutos, preferentemente durante un periodo de entre 30 y 90 minutos, más preferentemente durante un periodo de 90 minutos.
- 45 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el sujeto es un candidato probable para desarrollar escoliosis idiopática del adolescente.
12. Un método para estratificar un sujeto que tiene una escoliosis, comprendiendo dicho método:
- (a) medir un primer nivel de osteopontina (OPN) en una muestra biológica proveniente de dicho sujeto;
 - 50 (b) medir un segundo nivel de OPN en una muestra biológica correspondiente proveniente de dicho sujeto, en el que dicha muestra biológica correspondiente se obtiene después de que se ha aplicado un estímulo o fuerza mecánica a una o más partes del cuerpo de dicho sujeto;
 - (c) determinar una variación entre dicho primer nivel de OPN y dicho segundo nivel de OPN;
 - (d) comparar dicha variación con un valor de variación de control; y
 - 55 (e) estratificar dicho sujeto, basándose en dicha comparación.
13. Un kit para diagnosticar una predisposición a desarrollar una escoliosis más grave en un futuro, en un sujeto que tiene una escoliosis, comprendiendo dicho kit: (a) uno o más reactivos específicos para determinar niveles de osteopontina (OPN) en una muestra biológica; (b) instrucciones para diagnosticar una escoliosis o una predisposición a desarrollar una escoliosis en un sujeto; y (c) una banda hinchable o un manguito para el brazo, para aplicar un estímulo o fuerza mecánica sobre una o más partes del cuerpo de dicho sujeto.
- 60 14. Uso de una banda hinchable para diagnosticar una predisposición a desarrollar una escoliosis más grave en un futuro en un sujeto humano que tiene una escoliosis.
- 65

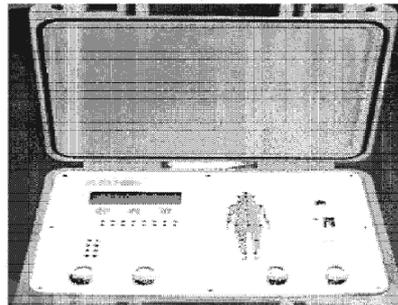
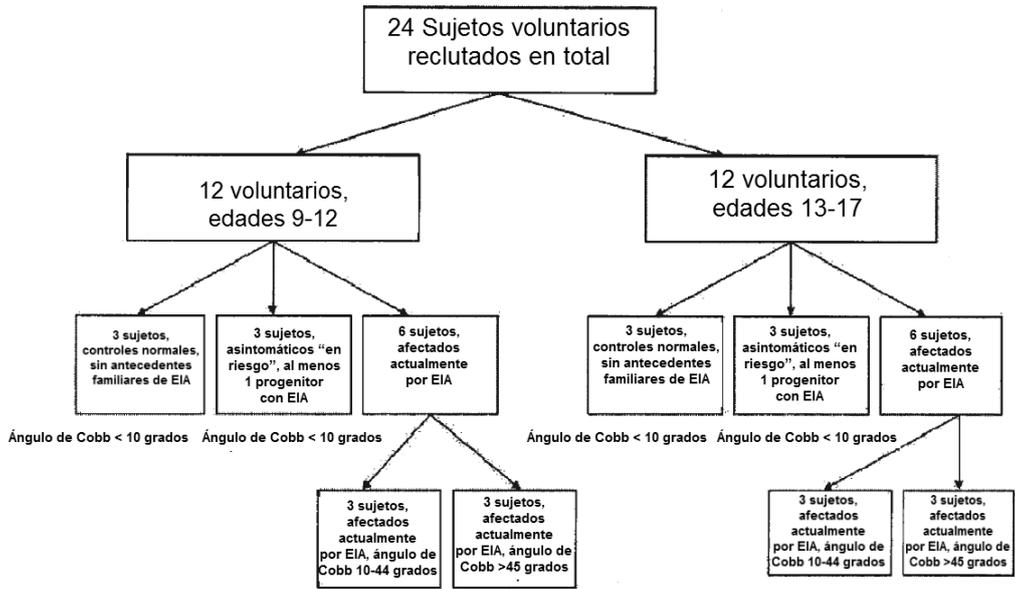


Fig. 4 Vista de la interfaz táctil del usuario del ABR Therapeutic Messenger

Estimulación mecánica

FIG. 1

Cambios de los niveles de OPN en pacientes después de 90 minutos de estimulación mecánica compresiva periódica, 0-4 psi, 0,006 Hz (p=0,002082)

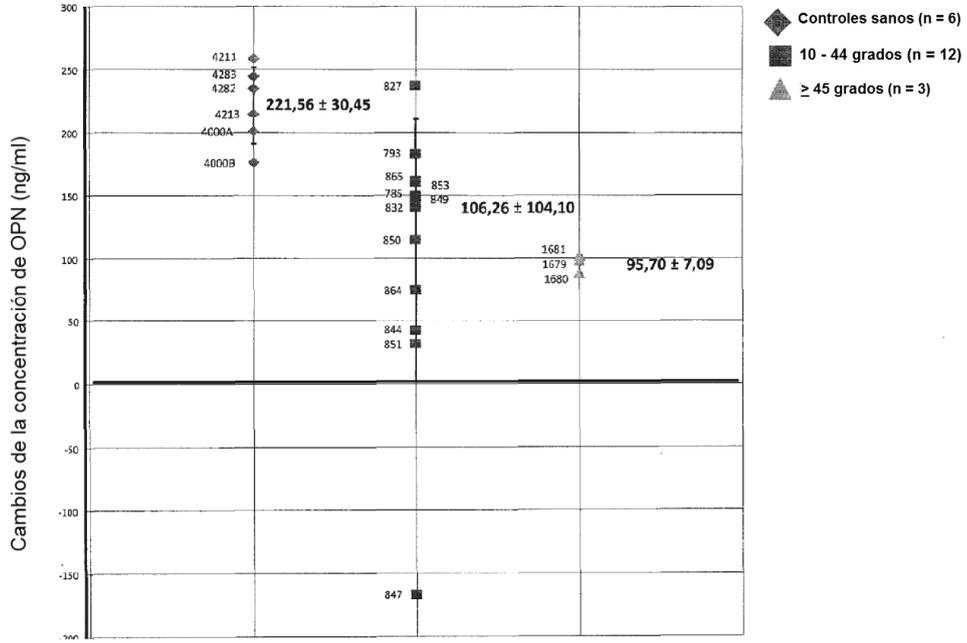


FIG. 2

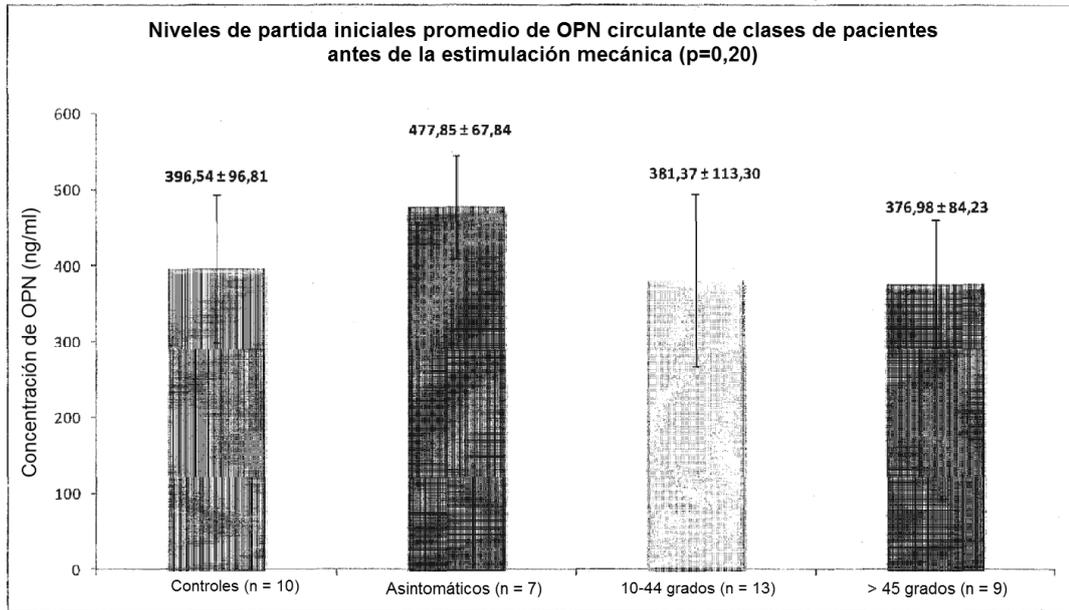


FIG. 3

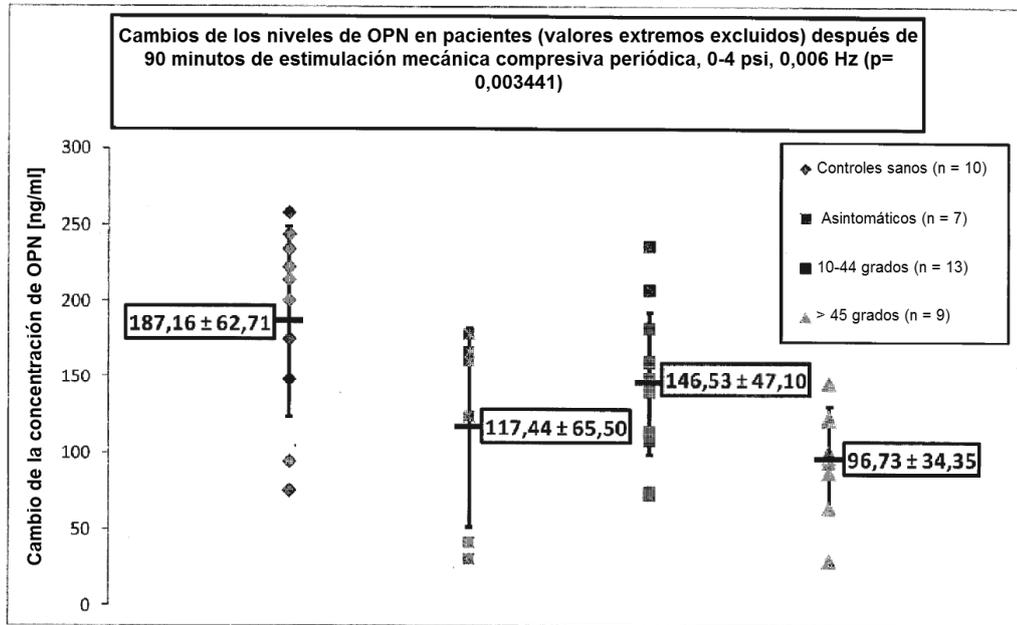


FIG. 4

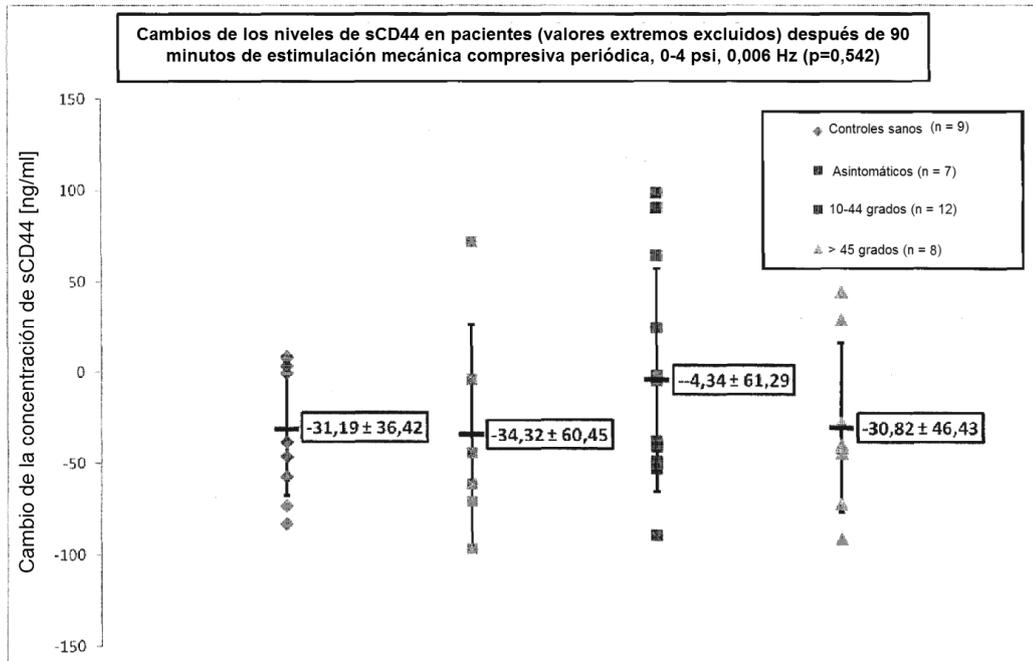


FIG. 5

ES 2 616 808 T3

NM_001040058 Variante de transcrito 1

```

1  ctccctgtgt  tgggtggagga  tgtctgcagc  agcattttaa  ttctgggagg  gcttgggtgt
61  cagcagcagc  aggaggaggc  agagcacagc  atcgtcggga  ccagactcgt  ctcaggccag
121  ttgcagcctt  ctcagccaaa  cgccgaccaa  ggaaaactca  ctaccatgag  aattgcagtg
181  atttgctttt  gcctcctagg  catcacctgt  gccataccag  ttaaacagge  tgattctgga
241  agttctgagg  aaaagcagct  ttacaacaaa  taccagatg  ctgtggccac  atggctaacc
301  cctgaccat  ctcagaagca  gaatctccta  gccccacaga  atgctgtgtc  ctctgaagaa
361  accaatgact  ttaaacaaga  gaccctcca  agtaagtcca  acgaaagcca  tgaccacatg
421  gatgatatgg  atgatgaaga  tgatgatgac  catgtggaca  gccaggactc  cattgactcg
481  aacgactctg  atgatgtaga  tgacactgat  gattctcacc  agtctgatga  gtctcaccat
541  tctgatgaat  ctgatgaact  ggtcaactgat  tttcccacgg  acctgccage  aaccgaagt
601  tcaactccag  ttgtcccac  agtagacaca  tatgatggcc  gaggtgatag  tgtggtttat
661  ggactgaggt  caaaatctaa  gaagtctgc  agacctgaca  tccagtaccc  tgatgctaca
721  gacgaggaca  tcacctcaca  catggaaagc  gaggagttag  atggtgcata  caaggccatc
781  cccgtgccc  aggacctgaa  cgccctctc  gattgggaca  gccgtgggaa  ggacagttat
841  gaaacgagtc  agctggatga  ccagagtgt  gaaaccaca  gccacaagca  gtccagatta
901  tataagcgg  aagccaatga  tgagagcaat  gagcattccg  atgtgattga  tagtcaggaa
961  ctttcaaag  tcagccgtga  attccacagc  catgaatttc  acagccatga  agatagctg
1021  gttgtagacc  ccaaaagtaa  ggaagaagat  aaacacctga  aatttogtat  ttctcatgaa
1081  ttgatagtg  catctctgga  ggtcaattaa  aaggagaaaa  aatacaattt  ctcactttgc
1141  atttagtcaa  aagaaaaaat  gctttatagc  aaaatgaaag  agaacatgaa  atgcttcttt
1201  ctcagtttat  tggttgaatg  tgtatctatt  tgagtctgga  aataactaat  gtggttgata
1261  attagtttag  tttgtggctt  catggaaact  cctgtaaac  taaaagcttc  agggttatgt
1321  ctatgttcat  totatagaag  aatgcaaac  tatcactgta  ttttaattat  tgttattctc
1381  tcatgaatag  aaatttatgt  agaagcaaac  aaaatacttt  taccacttta  aaaagagaat
1441  ataacatfff  atgtcaactat  aatcttttgt  tttttaagtt  agtgtatatt  ttgttgtgat
1501  tatctttttg  tgggtgtgaat  aatcttttta  ttttgaatgt  aataagaatt  tgggtgtgtc
1561  aattgcttat  ttgtttccc  acggtgtgac  agcaattaat  aaaacataac  ctttttact
1621  gcctaaaaaa  aaaaaaaaaa  a

```

NM_000582 Variante de transcrito 2

```

1  ctccctgtgt  tgggtggagga  tgtctgcagc  agcattttaa  ttctgggagg  gcttgggtgt
61  cagcagcagc  aggaggaggc  agagcacagc  atcgtcggga  ccagactcgt  ctcaggccag
121  ttgcagcctt  ctcagccaaa  cgccgaccaa  ggaaaactca  ctaccatgag  aattgcagtg
181  atttgctttt  gcctcctagg  catcacctgt  gccataccag  ttaaacagge  tgattctgga
241  agttctgagg  aaaagcagct  ttacaacaaa  taccagatg  ctgtggccac  atggctaacc
301  cctgaccat  ctcagaagca  gaatctccta  gccccacaga  acctccaag  taagtccaac
361  gaaagccatg  accacatgga  tgatattgat  gatgaagatg  atgatgacca  tgtggacagc
421  caggactcca  ttgactcgaa  cgactctgat  gatgtagatg  aactgatgta  ttctcaccag
481  tctgatgagt  ctcaccatct  tgatgaatct  gatgaactgg  tcaactgatt  tcccacggac
541  ctgccagcaa  ccgaagtfff  cactccagtt  gtcccacag  tagacacata  tgatggccga
601  ggtgatagtg  tggtttatgg  actgaggtca  aaatctaaga  agtttcgcag  acctgacatc
661  cagtacctg  atgctacaga  cgaggacatc  acctcacaca  tggaaagcga  ggagttgaat
721  ggtgcataca  aggccatccc  cgttgcccag  gacctgaacg  cgctctctga  ttgggacagc
781  cgtgggaagg  acagttatga  aacgagtcag  ctggatgacc  agagtgtgta  aaccacagc
841  cacaagcagt  ccagattata  taagcggaaa  gccaatgatg  agagcaatga  gcattccgat
901  gtgattgata  gtcaggaact  ttccaaagtc  agcogtgaat  tccacagcca  tgaatttcac
961  agccatgaag  atatgctggg  tgtagacccc  aaaagtaagg  aagaagataa  acacctgaaa
1021  tttcgtatff  ctcattgaatt  agatagtgca  tttctctgagg  tcaattaaaa  ggagaaaaaa
1081  tacaatttct  cacttttgc  ttagtcaaaa  gaaaaaatgc  tttatagcaa  aatgaaagag
1141  aacatgaaat  gcttctttct  cagtttatgt  gttgaatgtg  tatctatttg  agtctggaaa
1201  taactaatgt  gtttgataat  tagtttagtt  tgtggcttca  tggaaactcc  ctgtaactaa
1261  aaagcttcag  ggttatgtct  atgttcatct  tatagaagaa  atgcaactaa  tcaactgtatt
1321  ttaatatbttg  ttattctctc  atgaatagaa  atttatgtag  aagcaaacaa  aatactttta
1381  cccacttaaa  aagagaatat  aacattttat  gtcactataa  tcttttgttt  ttttaagttag
1441  tgtatatttt  gttgtgatta  tctttttgtg  gtgtgaataa  atcttttatc  ttgaatgtaa
1501  taagaatttg  gtgggtgcaa  ttgcttattt  gttttcccac  gttgtccag  caattaataa
1561  aacataacct  tttttactgc  ctaaaaaaaaa  aaaaaaaaaa  aaaaaaaaaa  aaaaaa

```

FIG. 6

ES 2 616 808 T3

NM_001040060 Variante de transcrito 3

```
1 ctccctgtgt tgggtggagga tgtctgcagc agcatttaaa ttctggggagg gcttggttgt
61 cagcagcagc aggaggaggc agagcacagc atcgtcggga ccagactcgt ctcaggccag
121 ttgcagcctt ctacagccaaa cgccgaccaa ggaaaactca ctaccatgag aattgcagtg
181 atttgctttt gcctcctagg catcacctgt gccataccag ttaaaccaggc tgattctgga
241 agttctgagg aaaagcagaa tgcctgtgccc tctgaagaaa ccaatgactt taaacaagag
301 acccttccaa gtaagtccaa cgaaagccat gaccacatgg atgatatgga tgatgaagat
361 gatgatgacc atgtggacag ccaggactcc attgactcga acgactctga tgatgtagat
421 gacactgatg attctcacca gtctgatgag tctcaccatt ctgatgaatc tgatgaactg
481 gtcactgatt ttcccacgga cctgccagca accgaagttt tcaactccagt tgtcccaca
541 gtagacacat atgatggccg aggtgatagt gtggtttatg gactgaggtc aaaatctaag
601 aagtttcgca gacctgacat ccagtaacct gatgctacag acgaggacat cacctcacac
661 atggaaagcg aggagttaa tgggtcatac aaggccatcc ccgttgccca ggacctgaac
721 gcgcttctg attgggacag ccgtgggaag gacagttatg aaacgagtca gctggatgac
781 cagagtgcg aaaccacag ccacaagcag tccagattat ataaagcggaa agccaatgat
841 gagagcaatg agcattccga tggattgat agtcaggaac ttccaaaagt cagccgtgaa
901 ttccacagcc atgaatttca cagccatgaa gatatgctgg ttgtagacc caaaagtaag
961 gaagaagata aacacctgaa atctcgtatt tctcatgaat tagatagtgc atcttctgag
1021 gtcaattaaa aggagaaaa atacaatttc tcaactttgca tttagtcaaa agaaaaaatg
1081 ctttatagca aatgaaaga gaacatgaaa tgcttcttc tcagtttatt gttgaaatgt
1141 gtatctatgt gagtctgaa ataactaatg tgtttgataa ttagtttagt ttgtggcttc
1201 atggaactc cctgtaaaact aaaagcttca ggttatgctc tagtttcatt ctatagaaga
1261 aatgcaaact atcaactgat tttaatattt gttattctc catgaataga aatttatgta
1321 gaagcaaca aaatactttt acccacttaa aaagagaata taacatttta tgctactata
1381 atcttttgtt ttttaagtta gtgtatattt tgttgtgatt atctttttgt ggtgtgaata
1441 aatcttttat cttgaatgta ataagaattt ggtggtgtca attgcttatt tgttttccca
1501 cggttgtcca gcaattaata aaacataacc ttttttactg ctaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

NP_001035147 Isoforma a

```
1 mriavicfcl lgitcaipvk qadsgsseek qlynkypdav atwlnpdpsq kqlllapqna
61 vsseetndfk getlpsksne shdhmddmdd eddddhvdsq dsidsndsdd vddtdshqs
121 deshhsdesd elvtdfptdl patevftpvv ptvdydgrg dsvvyglrsk skkfrpdig
181 ypdatdedit shmeselng aykaipvaqd lnapsdwsr gkdsyetsql ddqsaethsh
241 kqsrllykrka ndesnehsvd idsqelskvs refhshefhs hedmlvdpk skeedkhlkf
301 risheldsas sevn
```

NP_000573 Isoforma b

```
1 mriavicfcl lgitcaipvk qadsgsseek qlynkypdav atwlnpdpsq kqlllapqtl
61 psksneshdh mddmddeddd dhvdsqdsid sndsddvddt ddshqsdesd hsdeditvlt
121 dfptdlpate vftpvvptvd tydgrgdsvv yglrskskkf rrpdiqypda tdeditshme
181 seelngayka ipvaqdl nap sdwsrgkds yetsqlddqs aethshkqsr lykrkandes
241 nehsvdidsq elskvsrefh shefshhedm lvdpkskee dkhlkfrish eldsassevn
```

NP_001035149 Isoforma c

```
1 mriavicfcl lgitcaipvk qadsgsseek qnavsseetn dfkqetlpsk sneshdhmdd
61 mddeddddhv dsqdsidsnd sddvddtdds hqsdeshhsd esdelvtdfp tdlpatevft
121 pvvptvdyd grgdsvvvyl rskskkfrp diqypdatde ditshmesee lngaykaipv
181 aqdl napsdw dsrgkdsyet sqlddqsaet hshkqsrllyk rkandesneh svdidsqels
241 kvsrefhshe fhshedmlv dpkskeedkh lkfrisheld sasseven
```

FIG. 6 (continuación)