

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 826**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2009 E 15193948 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 3059323**

54 Título: **Detección de la predisposición genética a afecciones asociadas a la osteoartritis**

30 Prioridad:

02.05.2008 US 49992 P
01.12.2008 US 118744 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.04.2019

73 Titular/es:

ORIG3N, INC. (100.0%)
27 Drydock Avenue, 6th Floor
Boston, Massachusetts 02210, US

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 708 826 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 afecciones asociadas a 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: osteoartritis incidente, progresión de la osteoartritis, gravedad de la osteoartritis, disminución de la función física asociada y discapacidad.

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, 15 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 20 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 30 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.

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 envejecen. La prevalencia estimada 35 en Estados Unidos 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 Estados Unidos 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 Estados Unidos. La OA puede implicar una única articulación o múltiples articulaciones en el mismo individuo, centrándose la terapia 40 actual en el alivio del dolor ya que no hay ninguna terapia aprobada por la FDA que detenga o invierta el deterioro articular.

Dado el aumento previsto en la prevalencia de la osteoartritis, existe la necesidad de identificar factores de riesgo para osteoartritis incidente, progresión de la osteoartritis, disminución de la función física asociada a la osteoartritis y 45 discapacidad. 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 predictores de la progresión de OA. Dichos 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 50 pacientes será clínicamente útil para el tratamiento médico de los 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. Dicha 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 55 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 lo 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.

5

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* 2004;50(4):1179-86; 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):1106-12.). 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):1106-12). 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 existiendo la necesidad de un marcador fiable para predecir qué pacientes con osteoartritis experimentarán progresión de enfermedad grave.

20 Cribado de genotipo

Los métodos tradicionales para cribar 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 cribarse mediante métodos de biología molecular continúa creciendo al aumentar el entendimiento de la base genética de trastornos multifactoriales.

30

El cribado genético (también denominado genotipado o cribado molecular) puede definirse de manera amplia como pruebas para determinar si un paciente tiene mutaciones (alelos o polimorfismos) que o bien provocan una patología o bien están "ligados" a la mutación que provoca una patología. 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 típicamente, 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 lo tanto, en determinadas regiones cromosómicas, múltiples loci polimórficos que abarcan un dominio cromosómico amplio pueden estar en desequilibrio de ligamiento entre sí, y definir de este modo 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 lo 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.

5

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 su lugar, 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 lo 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 lo 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 afección particular y un haplotipo humano correspondiente. Por lo tanto, la determinación de la probabilidad de un individuo de desarrollar una enfermedad o afección 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.

25

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 ya descritos para IL-1 α (IL-1A), IL-1 β (IL-1B), y el antagonista del 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 lo tanto, el antagonista de receptor y el receptor de tipo II tienen ambos, 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, existen 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 de genes de IL-1. Por lo 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.

45

Se sabe que ciertos alelos de la agrupación génica de IL-1 están asociados con patologías particulares. Por ejemplo, se ha informado que el alelo 2 de IL-1RN (VNTR) (Pat. de Estados Unidos 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 a la OA. Además, se ha informado que el alelo 2 de IL-1RN (VNTR) está asociado a 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 Supp.): 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-1 A del marcador -889 y el alelo 2 de IL-1 B (Taql) del marcador +3954 están asociados a enfermedad periodontal (Pat. de Estados Unidos 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-1 A del marcador -889 está asociado a artritis crónica juvenil, particularmente iridociclitis crónica

55

- (McDowell, et al. (1995) *Arthritis Rheum.* 38: 221-28). También se ha encontrado que el alelo 2 de IL-1 B (TaqI) del marcador +3954 de IL-1 B está asociado a 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). Además, se ha encontrado que el alelo 1 de IL-1RN (VNTR) está asociado a retinopatía diabética (véanse los documentos U.S. N.º de Serie 09/037472, y PCT/GB97/02790). Además, se ha encontrado que el alelo 2 de IL-1RN (VNTR) está asociado a 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).
- 10 La descripción en el presente documento de desventajas y problemas asociados con composiciones y métodos conocidos no pretende de ninguna manera limitar el alcance de las formas de realización descritas en este documento hasta su exclusión. De hecho, ciertas formas de realización pueden incluir una o más composiciones, compuestos o métodos conocidos sin padecer las desventajas o problemas mencionados.
- 15 La descripción anterior de la técnica relacionada no pretende ser de ninguna manera una admisión de que cualquiera de los documentos descritos en la misma, incluidas las solicitudes de patente pendientes de Estados Unidos, son técnicas anteriores a la presente invención.

RESUMEN DE LA INVENCION

- 20 La presente invención se define de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. En el presente documento se divulgan nuevos métodos y kits para determinar si un sujeto está predispuesto a desarrollar OA y/o afecciones relacionadas con OA. En un aspecto, la presente divulgación proporciona nuevos métodos y kits para determinar si un sujeto que tiene OA está predispuesto a un mayor riesgo de progresión grave de la enfermedad de la OA. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona nuevos métodos y kits para determinar si un sujeto está predispuesto a un menor riesgo de progresión grave de la enfermedad de la OA.

- En aún otro aspecto, la presente divulgación proporciona nuevos métodos y kits para determinar si un sujeto está predispuesto a un mayor riesgo de disminución de la función física asociada a la OA. En aún otro aspecto, la presente divulgación proporciona nuevos métodos y kits para determinar si un sujeto está predispuesto a un menor riesgo de disminución de la función física asociada a la osteoartritis. La disminución de la función física asociada a la OA se puede determinar utilizando cualquier método conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, midiendo la anchura del espacio articular (JSW) y/o el estrechamiento del espacio articular (JSN). Por consiguiente, otro aspecto de la invención proporciona nuevos métodos y kits para determinar si un sujeto está predispuesto a un mayor riesgo de estrechamiento del espacio articular. En aún otro aspecto, la presente descripción proporciona nuevos métodos y kits para determinar si un sujeto está predispuesto a un menor riesgo de estrechamiento del espacio articular.

- Se proporcionan métodos para detectar la predisposición a un mayor riesgo de progresión grave de la enfermedad y/o estrechamiento del espacio articular de la osteoartritis en un sujeto que comprende la detección de uno cualquiera, dos cualesquiera o los tres siguientes: a) genotipo G/G en IL1RN rs9005 G>A; b) genotipo T/T en IL1RN rs419598 T>C; y/o c) genotipo T/C o C/C en IL1RN rs315952 T>C; en donde la presencia de uno cualquiera, dos cualesquiera, o los tres genotipos indica que el sujeto está predispuesto a la progresión grave de la enfermedad de la osteoartritis y la ausencia de los tres genotipos indica que el sujeto no está predispuesto a la progresión grave de la enfermedad de la osteoartritis.

- 45 Se proporcionan métodos para detectar la predisposición a un menor riesgo de progresión grave de la enfermedad y estrechamiento del espacio articular de la osteoartritis en un sujeto que comprende detectar en el sujeto una o dos copias del siguiente haplotipo: IL1RN rs9005 G>A (A), IL1RN rs419598 T>C (C), IL-RN rs315952 (T).

- 50 Se proporcionan métodos para seleccionar sujetos con osteoartritis para la inclusión o exclusión de ensayos clínicos en función de la probabilidad de su progresión de la enfermedad y el estrechamiento del espacio articular de la osteoartritis, que comprende tipificar el ácido nucleico del sujeto en uno o más de los loci polimórficos seleccionados del grupo que consiste en IL1RN rs9005 G>A, IL1RN rs419598 T>C, e IL1RN rs315952 T>C, en donde el genotipo del sujeto con respecto a dichos loci proporciona información sobre el riesgo del sujeto de progresión grave de la enfermedad de osteoartritis, y permite la selección de sujetos del estudio que sean adecuados para los criterios del ensayo clínico.

Se proporcionan métodos para seleccionar un

régimen terapéutico apropiado para un sujeto que padece osteoartritis que comprende tipificar el ácido nucleico del sujeto en uno o más de los loci polimórficos seleccionados del grupo que consiste en IL1RN rs9005 G>A, IL1RN rs419598 T>C, e IL1RN rs315952 T>C, en donde el genotipo del sujeto con respecto a dichos loci proporciona información sobre el riesgo del sujeto de progresión grave de la enfermedad y el estrechamiento del espacio articular de la osteoartritis, y permite la selección de un régimen terapéutico o una recomendación de estilo de vida que sea adecuada para la susceptibilidad del sujeto a la progresión grave de la enfermedad de la osteoartritis.

Se proporcionan métodos para tratar o retardar la progresión de la enfermedad y el estrechamiento del espacio articular de la osteoartritis en un sujeto que comprenden: a) detectar en el sujeto uno cualquiera, dos cualesquiera o los tres siguientes: genotipo G/G en IL1RN rs9005 G>A; genotipo T/T en IL1RN rs419598 T>C; y/o genotipo T/C o C/C en IL1RN rs315952 T>C; y b) administrar a dicho sujeto un agente terapéutico que compense la progresión de la enfermedad y el estrechamiento del espacio articular de la osteoartritis.

Se proporcionan métodos para el tratamiento médico de la osteoartritis por estratificación de edad que comprende detectar en un sujeto uno cualquiera, dos cualesquiera o los tres siguientes: a) genotipo G/G en IL1RN rs9005 G>A; b) genotipo T/T en IL1RN rs419598 T>C; y/o c) genotipo T/C o C/C en IL1RN rs315952 T>C; en donde la presencia de uno cualquiera, dos cualesquiera o tres de estos genotipos indica que el sujeto está predispuesto a una progresión grave de la enfermedad y el estrechamiento del espacio articular de la osteoartritis, y la ausencia del genotipo indica que el sujeto no está predispuesto a una progresión grave de la enfermedad o el estrechamiento del espacio articular de la osteoartritis, y proporcionar recomendaciones para el tratamiento médico de la osteoartritis de acuerdo con las necesidades previstas del sujeto a ciertas edades.

Los kits de la presente divulgación pueden incluir un medio para determinar si un sujeto porta al menos un alelo que comprende un alelo o haplotipo asociado a OA. El kit también puede contener un medio de recolección de muestras. 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.

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERIDAS

La presente invención se basa, al menos en parte, en la identificación de ciertos alelos inflamatorios y patrones de haplotipo y la asociación (hasta un grado estadísticamente significativo) de estos patrones con el desarrollo de afecciones relacionadas con la OA tales como progresión de la enfermedad de OA y progresión de JSN. Por lo 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 una afección relacionado con la 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. 2004 May;50(5): 1360-5). La progresión de la enfermedad en la 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 lo tanto, se proporcionan métodos para seleccionar un régimen terapéutico apropiado para un sujeto que padece osteoartritis que comprende tipificar el ácido nucleico del sujeto en uno o más de los loci polimórficos seleccionados del grupo que consiste en IL1RN rs9005 G>A, IL1RN rs419598 T>C, e IL1RN rs315952 T>C, en donde el genotipo del sujeto con respecto a dichos loci proporciona información sobre el riesgo del sujeto de progresión grave de la enfermedad y el estrechamiento del espacio articular de la osteoartritis, y permite la selección de un régimen terapéutico o una recomendación de estilo de vida que sea adecuada para la susceptibilidad del sujeto a la progresión grave de la enfermedad de la osteoartritis. Se pueden seleccionar regímenes de tratamiento o medidas preventivas para tratar o prevenir agresivamente la progresión de la

OA en sujetos predispuestos a un mayor riesgo de padecer afecciones de OA. Por lo tanto, los métodos de la presente invención permiten individualizar. Por ejemplo, un sujeto que tenga cualquiera, dos cualesquiera o tres de los siguientes: genotipo G/G en IL1RN rs9005 G>A; genotipo T/T en IL1RN rs419598 T>C; y/o el genotipo T/C o C/C en IL1RN rs315952 T>C tiene una predisposición a un mayor riesgo de progresión y se beneficiaría de un régimen de tratamiento/prevenición agresivo que compensaría la tasa aumentada relativa de ese sujeto de progresión de la enfermedad y de estrechamiento del espacio articular de la artrosis.

Se proporcionan métodos para seleccionar un régimen terapéutico apropiado para un sujeto que padece osteoartritis que comprende tipificar el ácido nucleico del sujeto en uno o más de los loci polimórficos seleccionados del grupo que consiste en IL1A (+4845) rs17561 (G>T), IL1B (+3954) rs1143634 (C>T), IL1B (-511) rs16944 (C>T), IL1B (-3737) rs4848306 (C>T), TNF- α (-308) rs1800629 (G>A), e IL-1RN rs315952 (T>C), en donde el genotipo del sujeto con respecto a dichos loci proporciona información sobre el riesgo del sujeto de desarrollar OA generalizada, y permite la selección de un régimen terapéutico o una recomendación de estilo de vida que sea adecuada para la susceptibilidad del sujeto a la progresión grave de la enfermedad de la osteoartritis. Se pueden seleccionar regímenes de tratamiento o medidas preventivas para tratar o prevenir agresivamente la progresión de la OA en sujetos predispuestos a un mayor riesgo de padecer afecciones de OA. Por lo tanto, los métodos de la presente invención permiten la terapia individualizada. Por lo tanto, pueden centrarse recursos médicos valiosos en aquellos sujetos con mayor probabilidad de experimentar una progresión grave de la enfermedad de la OA.

El conocimiento de los alelos particulares asociados con una susceptibilidad a desarrollar osteoartritis, en solitario o junto con información sobre otros factores contribuyentes de OA permite una personalización de la prevención o el tratamiento de acuerdo con el perfil genético del individuo, el objetivo de la "farmacogenómica". Por lo 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 afecciones asociadas a la OA. Dichos 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 productos terapéuticos contra la OA se refieren a cualquier agente o régimen terapéutico (incluyendo medios farmacéuticos, nutracéuticos y quirúrgicos) que prevenga o retrase el desarrollo de, o alivie los síntomas de, la 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 sin limitación, glucosamina, sulfato de condroitina, doxiciclina, risedronato, diacereína e hialuronano IA. 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 de la 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.

Están disponibles varias escalas de clasificación en grados 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 sin limitación, las escalas de clasificación de Kellgren-Lawrence, Ahlback, y Brandt. Véanse 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; [suppl 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 radiográfica de Kellgren-Lawrence y la escala de clasificación 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 son equivalentes para la evaluación de la presencia y la gravedad de la osteoartritis.

Escala de clasificación radiográfica de Kellgren-Lawrence de la osteoartritis

10

Grado de Osteoartritis	
Descripción	
0 - ninguna	Sin hallazgos radiográficos de osteoartritis
1 - Dudosa	Osteofitos minúsculos de dudosa importancia 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 radiográfica de Brandt de la 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

15 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 espesor del cartílago articular. La pérdida de espacio articular dentro de la rodilla se ha equiparado con la pérdida de cartílago articular. Por lo 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 controlar 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. Como alternativa, se puede usar 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.

35 Ensayos clínicos

Existen varios estudios que informan de los ensayos clínicos de supuestos fármacos contra OA modificadores de la enfermedad (DMOAD). Los métodos de la presente invención 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. De acuerdo con una forma de 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 productos 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).

10

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 forma de 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 forma de 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. Dichos 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 $T_{\text{fusión}} = [2X(n.^{\circ} \text{ de A o T}) + 4X(n.^{\circ} \text{ de G o C})]$.

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. Dichos 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.

Está disponible una diversidad de métodos para detectar la presencia de un alelo polimórfico de un único nucleótido particular en un individuo. Los avances en este campo han proporcionado un 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. Aún 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.

5

Se han desarrollado varios métodos para facilitar el análisis de polimorfismos de un único nucleótido. En un aspecto, el polimorfismo de una única base puede detectarse usando un nucleótido resistente a exonucleasa especializado, como se divulga, por ejemplo, en Mundy, C. R. (Pat. de Estados Unidos N.º 4.656.127). De acuerdo con el método, se permite que un cebador complementario a la secuencia alélica inmediatamente en 3' con respecto al sitio
10 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. Dicha incorporación hace que el cebador sea resistente a exonucleasa, y permite de este modo 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
15 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.

En otro aspecto de la divulgación, se usa un método basado en disolución para determinar la identidad del
20 nucleótido de un sitio polimórfico. Cohen, D. et al. (Patente francesa 2.650.840; Sol. PCT N.º WO91/02087). Como en el método de Mundy de la Pat. de Estados Unidos 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.

25

Un método alternativo, conocido como análisis de fragmentos genéticos o GBA™ se describe por Goelet, P. et al. (Sol. 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 lo tanto, el terminador marcado que se incorpora se determina mediante el, y es complementario al, nucleótido presente en el sitio polimórfico de la
30 molécula diana que está evaluándose. Al contrario que el método de Cohen et al. (Patente francesa 2.650.840; Sol. 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.

Recientemente, se han descrito varios procedimientos de incorporación de nucleótidos guiados por cebador para
35 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); Kuppaswamy, 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 difieren de GBA™ en cuanto a que todos ellos se basan en la incorporación de desoxinucleótidos marcados para
40 distinguir entre bases en un sitio polimórfico. En tal formato, 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
45 proteínas (PTT) ofrece un enfoque de diagnóstico eficaz (Roest, et. al., (1993) Hum. Mol. Genet. 2:1719-2 1; 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. Después, se usan los productos de PCR de transcripción inversa como molde para la amplificación por PCR anidada con un cebador que contiene un
50 promotor de ARN polimerasa y una secuencia para iniciar la traducción eucariota. Después de 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 poliacrilamida-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)
55 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 ácidos nucleicos para su uso en el diagnóstico descrito en el presente documento. En un aspecto preferido, la muestra de ADN se obtiene de un líquido corporal, por ejemplo, sangre, obtenida mediante técnicas conocidas (por ejemplo, venopunción) o saliva. Como

alternativa, 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).

10 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 o 30 nucleótidos alrededor de la mutación o región polimórfica. En un aspecto preferido de la divulgación, 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 "matrices de sondas de ADN", se describe, por ejemplo, en Cronin et al. (1996) Human Mutation 7:244. En un aspecto, un chip comprende todas las variantes alélicas de al menos una región polimórfica de un gen. Después, 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 sin limitación, 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).

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

40 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. Como alternativa, es posible amplificar diferentes marcadores con cebadores que están marcados de manera diferencial y, por lo 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 un aspecto meramente ilustrativo, 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.

55 En un aspecto preferido del ensayo objeto, 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 otro aspecto, puede usarse cualquiera de una diversidad 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 Maxam 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
 5 diversidad 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 formas de realización, se necesita determinar la aparición de sólo una, dos o tres de las bases de ácido nucleico en
 10 la reacción de secuenciación. Por ejemplo, puede realizarse el siguiente de A, o similares, por ejemplo, cuando sólo se detecta un ácido nucleico.

En una forma de 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
 15 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 silvestre 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
 20 ARN/ADN con ARNasa y tratarse híbridos de ADN/ADN con S1 nucleasa para digerir enzimáticamente las regiones con apareamiento erróneo. En otros aspectos, pueden tratarse dúplex o ADN/ADN o 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 desnaturizantes para determinar el sitio de mutación. Véanse, por ejemplo, Cotton et al (1988) *Proc.*
 25 *Natl Acad Sci USA* 85:4397; y Saleeba et al (1992) *Methods Enzymol.* 217:286-295. En un aspecto preferido, el ADN o ARN de control puede etiquetarse para la detección.

En aún otro aspecto, la reacción de escisión de apareamiento erróneo emplea una o más proteínas que reconocen
 30 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). De acuerdo con una forma de realización ejemplar, 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 o más células de ensayo. Se trata el dúplex con una enzima de reparación de apareamiento erróneo de ADN, y los productos de escisión, si los
 35 hay, pueden detectarse a partir de protocolos de electroforesis o similares. Véase, por ejemplo, la Pat. de Estados Unidos N.º 5.459.039.

En otros aspectos, 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
 40 movilidad electroforética entre ácidos nucleicos mutantes y de tipo silvestre (Orita et al. (1989) *Proc Natl. Acad. Sci USA* 86:2766, véanse también Cotton (1993) *Mutat Res* 285:125-144; y Hayashi (1992) *Genet Anal Tech Appl* 9:73-79). Se desnaturizan 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 de acuerdo con la secuencia, la alteración resultante en la movilidad electroforética permite la detección incluso de un cambio de
 45 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 un aspecto preferido, 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).

50 En aún otro aspecto, se somete a ensayo el movimiento de alelos en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente de agente desnaturizante usando electroforesis en gel con gradiente de desnaturización (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
 55 40 pb de ADN rico en GC con alto punto de fusión mediante PCR. En una forma de realización adicional, se usa un gradiente de temperatura en lugar de un gradiente de agente desnaturizante para identificar diferencias en la movilidad de ADN de control y de muestra (Rosenbaum y Reissner (1987) *Biophys Chem* 265:12753).

Los ejemplos de otras técnicas para detectar alelos incluyen, pero sin limitación, 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). Dichas técnicas de hibridación de oligonucleótidos 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.

- 10 Como alternativa, 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 ciertos aspectos también pueda realizarse la 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.

En otra forma de realización, se realiza la identificación de la variante alélica usando un ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA), como se describe, por ejemplo, en la Pat. de Estados Unidos 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, biotinilado, 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 después se detecta usando OLA.

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 Pat. de Estados Unidos N.º 5.593.826 divulga 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 fosforamido. 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 de rábano picante. Este sistema permite la detección de los dos alelos usando un formato de alto rendimiento que conduce a la producción de dos colores diferentes.

Otro aspecto de la divulgación está dirigido a kits para detectar una predisposición para desarrollar una reestenosis. Este kit puede contener uno o más oligonucleótidos, incluidos los oligonucleótidos 5' y 3' que hibridan en 5' y 3' con al menos un alelo de un haplotipo de locus IL-1. Los oligonucleótidos de amplificación de PCR deben hibridar entre 25 y 2500 pares de bases, preferiblemente entre aproximadamente 100 y aproximadamente 500 bases, para producir un producto de PCR de tamaño conveniente para su posterior análisis.

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

SNP	SEQ ID NO:	Propósito	Secuencia
IL1RN rs9005 G>A	SEQ ID NO: 1	PCR	TGAGCAAATGTGGCTCCTGG GGGTTCT
	SEQ ID NO: 2	PCR	CCCAAAGCCTGTCAAGGCCA AGGACAT

	SEQ ID NO: 3	SBE	GATGGCTGTGCCTCTGCCTGT CTCCCCACC
	SEQ ID NO: 4	PCR	ACAAGTTCTGGGGACACAG
	SEQ ID NO: 5	PCR	AGGCCATGCTGCTGCAGACA
IL1RN rs419598 T>C	SEQ ID NO: 6	SBE	GACCTTCTATCTGAGGAACA ACCAACTAGTTGC
	SEQ ID NO: 7	PCR	GCCTCAGCTCTCACCTGCCCA TCTTTTG
IL1RN rs315952 T>C	SEQ ID NO: 8	PCR	AGGCAGCATGGAGGCTGGTC AGTTGAA
	SEQ ID NO: 9	SBE	GACAAGCGCTTCGCCTTCATC CGCTCAGACAG
PCR = Reacción en cadena de la polimerasa SBE = Genotipado de extensión de base única			

El diseño de oligonucleótidos adicionales para su uso en la amplificación y detección de alelos polimórficos de IL-1 por el método de la invención se facilita por la disponibilidad tanto de información de secuencia actualizada del cromosoma humano 2q13 (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-1 A, IL-1B e IL-1RN puede encontrarse en el sitio web del National Center for Biotechnology Information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando el Acceso a 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)).

En otro aspecto, la divulgación presenta kits para realizar los ensayos descritos anteriormente. De acuerdo con algunos aspectos, los kits de la presente divulgación pueden incluir medios para determinar si un sujeto porta al menos un alelo que comprende un haplotipo o alelo asociado a 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 (PNA), 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.

Como se ha descrito 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 de 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 ensayarse. 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 ensayarse 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 lo tanto, los oligonucleótidos pueden flanquear el marcador de interés (tal como se requiere para amplificación por PCR) o 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 (en solitario 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 la afección particular. Además, la información puede permitir un enfoque más personalizado para prevenir la aparición o progresión de la enfermedad o la afección. Por ejemplo, esta información puede permitirle a un médico recetar más eficazmente una terapia que tratará la base molecular de la enfermedad o la afección.

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 sin limitación, sustratos, tales como papeles de filtro, AmpliCard™ (University of Sheffield, Sheffield, England 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.

35 Definiciones

A menos que se defina otra cosa, 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 los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación, se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, tendrá prioridad la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos, no pretenden ser limitativos. Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

Para los fines de promover una comprensión de las formas de realización descritas en el presente documento, se hará referencia a formas de realización preferidas y se usará un lenguaje específico para describir las mismas. La terminología utilizada en el presente documento es únicamente con el fin de describir formas de realización particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención. 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 otra cosa. Por lo 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, etc.

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.

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. Como alternativa, 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. Como alternativa, un patrón alélico puede consistir en la identidad de alelos en más de un sitio polimórfico.

10 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. Como alternativa, 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.

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 silvestre. El fragmento bioactivo es preferiblemente un fragmento que puede interactuar con un receptor de interleucina.

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 a ensayar. 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 de 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 detección de una proteína mutada, la muestra de control puede comprender una muestra de proteína mutante. Sin embargo, se prefiere que la muestra de control comprenda el material a ensayar. 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 a ensayar es ADN genómico, la muestra de control es preferiblemente una muestra altamente purificada de ADN genómico.

Las frases "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 silvestre del gen. La interrupción puede provocarse mediante delecciones, inserciones o modificaciones en el gen, o cualquier combinación de las mismas.

Se pretende que el término "haplotipo" 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 ($P_{corr} < 0,05$). 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" 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-1 A, IL-1 B e IL-1RN y cualquier otra secuencia unida. (Nicklin et al., Genomics 19: 382-84, 1994). Los términos "IL-1 A", "IL-1 B" e "IL-1RN" 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 acceso 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. Como se usa adicionalmente en el presente documento, el término "alelo X de IL-1 (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 homocigoto, o que tiene el estado homocigoto. Cuando un sujeto tiene dos alelos de IL-1RN diferentes, se dice que el sujeto es heterocigoto, o que tiene el estado heterocigoto. El término "alelo 2,2 de IL-1RN (+2018)" se refiere al estado de alelo 2 de IL-1RN (+2018) homocigoto. Por el contrario, el término "alelo 1,1 de IL-1RN (+2018)" se refiere al estado de alelo 1 de IL-1RN (+2018) homocigoto. El término "alelo 1,2 de IL-1 RN (+2018)" se refiere al estado de alelo 1 y 2 heterocigoto.

Como alternativa, 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.

"Relacionado con IL-1" como se usa en el presente documento, pretende incluir 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 interleucina-1a, el gen de IL-1 B que codifica interleucina-1 β , y el gen de IL-1RN (o IL-1 ra) que codifica el antagonista del 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-1a, 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-1a 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 lo tanto, el término IL-1 incluye polipéptidos secretados que promueven una respuesta inflamatoria, tales como IL-1 α 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. 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 Pat. de Estados Unidos 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" incluyan polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos codificada por las secuencias de ADN genómico de IL-1 identificadas por los números de acceso a GenBank X03833, X04500 y X64532, o fragmentos de los mismos, y homólogos de los mismos e incluyen polipéptidos agonistas y antagonistas.

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

El término "interaccionar" como se usa en el presente documento, pretende incluir 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.

El término "aislado" 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 de origen natural, y mucho más preferiblemente menos de 1,5 kb de tal secuencia de flanqueo de origen natural. El término aislado 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, un "ácido nucleico aislado" pretende incluir 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.

10

"Desequilibrio de ligamiento" se refiere a la herencia conjunta de dos alelos a frecuencias mayores que lo que se esperaría 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 aparecen 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-1 RN (VNTR), que son el alelo 1 y el alelo 2.

30

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).

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 causado por una mutación puede corregirse o compensarse mediante ciertos agentes. Si un sujeto debe ser homocigoto 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 homocigoto para el gen de tipo silvestre y el de un sujeto homocigoto para el gen mutado, se dice que la mutación es codominante.

Un "animal no humano" 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.

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 a la forma de 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 por la presente que están asociados con, o predicen, la incidencia en un sujeto de desarrollar una enfermedad particular (por ejemplo, una enfermedad vascular). Por lo tanto, los alelos se representan de manera excesiva en cuanto a la frecuencia en individuos con enfermedad en comparación con individuos sanos. Por lo tanto, estos alelos pueden usarse para predecir la enfermedad incluso en individuos antes de los síntomas o antes de la enfermedad.

"Molécula pequeña" como se usa en el presente documento, pretende referirse a una composición que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 5 kD y mucho 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.

Como se usa en el presente documento, el término "se híbrida 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 unidas operativamente.

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 inactivación). 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.

El término "tratar" como se usa en el presente documento, pretende incluir curar así como mejorar al menos un síntoma de una afección 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 usada comúnmente. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión tales como para que sirvan para funciones equivalentes y que lleguen a conocerse en la técnica posteriormente a la presente.

El término "alelo de tipo silvestre" 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 silvestre. Puede haber varios alelos de tipo silvestre 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.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos, pero no limitativos, de los métodos y composiciones de la presente invención.

55 EJEMPLO 1

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

Antecedentes/propósito: Sigue existiendo la 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 la 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.

5

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 por debajo de la mediana. Se realizó un análisis estadístico usando la prueba exacta de Fisher y la Chi cuadrado, con regresión logística, con ajustes para la edad, sexo e IMC para evaluar asociaciones de gravedad radiográfica con SNP individuales y con haplotipos.

10

15

Resultados: Tras el ajuste de la edad, sexo e IMC, los SNP de antagonista de receptor de IL1 (IL1RN) individuales estaban fuertemente asociados con la gravedad radiográfica de KL y anchura del espacio articular (JSW; Tabla 1). Además, portar 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%) se asoció con un riesgo sustancialmente disminuido de gravedad radiográfica (OR de 0,14; 95% de IC de 0,05-0,37), y con un aumento de la JSW (3,99 ± 1,76 mm frente a 3,16 ± 1,94 mm; p = 0,0056) en comparación con el 68% restante de la población con OA.

20

25

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	OR (95% de IC)	p	OR (95% de IC)
IL1RN rs9005 G>A	GG	55%	<0,0 002	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%	0,0153.	09 (1,22-1,79)	NS	NS
	TT	52%				

30

Aunque la invención se ha descrito con referencia a formas de realización y ejemplos particularmente preferidos, los expertos en la técnica reconocen que pueden realizarse diversas modificaciones a la invención.

LISTA DE SECUENCIAS

35

<110> Interleukin Genetics, Inc.

<120> Detección de la predisposición genética a afecciones asociadas a la osteoartritis

40

<130> ILGN-038D01EP

<140> Divisoria del documento EP09740020.4

<141> 04-05-2009

45

<150> 61/049.992

<151> 02-05-2008

<150> 61/118.744

<151> 01-12-2008

50

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.5
 5 <210> 1
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> SEQ ID NO: 1; secuencia cebador
 <400> 1
 tgagcaaatg tggctcctgg gggttct 27
 15 <210> 2
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> SEQ ID NO: 2; secuencia cebador
 <400> 2
 25 cccaaagcct gtcaaggcca aggacat 27
 <210> 3
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> SEQ ID NO: 3; secuencia cebador
 <400> 3
 35 gatggctgtg cctctgcctg tctccccac c 31
 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> SEQ ID NO: 4; secuencia cebador
 45 <400> 4
 acaagtctg ggggacacag 20
 <210> 5
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> SEQ ID NO: 5; secuencia cebador
 <400> 5
 aggccatgct gctgcagaca 20
 <210> 6

<211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> SEQ ID NO: 6; secuencia cebador
 <400> 6
 10 gacctctat ctgaggaaca accaactagt tgc 33
 <210> 7
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> SEQ ID NO: 7; secuencia cebador
 <400> 7
 20 gcctcagctc tcacctgcc atctttg 28
 <210> 8
 <211> 27
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> SEQ ID NO: 8; secuencia cebador
 30 <400> 8
 aggcagcatg gagcctggtc agtgaa 27
 <210> 9
 <211> 32
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> SEQ ID NO: 9; secuencia cebador
 40 <400> 9
 gacaagcgt tcgcctcat ccgctcagac ag 32

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la predisposición a la progresión de la enfermedad de osteoartritis y el estrechamiento del espacio articular relacionado con la osteoartritis en un sujeto que comprende detectar en el sujeto el genotipo en IL1RN rs419598 T>C; en el que la presencia del genotipo T/T indica que el sujeto está predispuesto a la progresión de la enfermedad y al estrechamiento del espacio articular; y en el que la presencia del genotipo C/C o T/C indica que el sujeto está protegido de la progresión de la enfermedad y del estrechamiento del espacio articular.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además detectar en el sujeto el genotipo en IL1RN rs315952 T>C e IL1RN rs9005 G>A; en el que la presencia del genotipo en T/C o C/C en IL1RN rs315952, el genotipo G/G en IL1RN rs9005, y el genotipo T/T en IL1RN rs419598 indica que el sujeto está predispuesto a la progresión de la enfermedad y al estrechamiento del espacio articular; y en el que la presencia del genotipo T/T en IL1RN rs315952, el genotipo A/A o G/A en IL1RN rs9005, y el genotipo C/C o T/C en IL1RN rs419598 indica que el sujeto está protegido contra la progresión de la enfermedad y el estrechamiento del espacio articular.
- 15 3. Un método para seleccionar sujetos de osteoartritis para su inclusión o exclusión en un ensayo clínico que comprende determinar la predisposición para la progresión de la enfermedad de la osteoartritis y el estrechamiento del espacio articular relacionado con la osteoartritis en un sujeto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, e incluir o excluir a dicho sujeto del ensayo clínico de acuerdo con el riesgo del sujeto y los criterios del ensayo clínico.
- 20 4. Un método de acuerdo con 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 5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que antes de, o junto con dicha etapa de, la muestra de ácido nucleico se somete a una etapa de amplificación.
- 30 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende además proporcionar recomendaciones para el tratamiento médico de la osteoartritis basándose en las necesidades predichas del sujeto a ciertas edades.
- 35