

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 756 173**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2014 PCT/US2014/054550**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2015 WO15038474**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2014 E 14844103 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3044336**

54 Título: **Un índice transcriptómico para la caracterización de la respuesta de reparación celular después de una lesión de los tejidos blandos en articulaciones diartrodiales**

30 Prioridad:

12.09.2013 US 201361877011 P

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

27.04.2020

73 Titular/es:

**RUSH UNIVERSITY MEDICAL CENTER (100.0%)
1653 W. Congress Parkway
Chicago, IL 60612, US**

72 Inventor/es:

**CHAN, DEVA;
LI, JUN;
PLAAS, ANNA, H.K.;
SANDY, JOHN, D. y
WANG, VINCENT**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 756 173 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

Un índice transcriptómico para la caracterización de la respuesta de reparación celular después de una lesión de los tejidos blandos en articulaciones diartrodiales

5

Campo técnico

La presente invención se refiere de forma general a los métodos para la determinación de la calidad de la recuperación de una lesión articular y a los métodos de tratamiento de la lesión articular sobre la base de dichas determinaciones.

10

Antecedentes

Unos grados de fuerza crecientes aplicados sobre las articulaciones dan como resultado una lesión articular. Dicha lesión articular se observa frecuentemente como el resultado de un traumatismo, por ejemplo, a menudo se observan lesiones condriales en atletas, y normalmente están asociadas con una inflamación aguda. El tratamiento de las lesiones articulares (tales como una ruptura de ligamentos o un desgarro del menisco) y la rehabilitación del paciente después de dichas lesiones implica diversos componentes. El cuidado inmediato después de la lesión normalmente incluye reposo, la aplicación de frío, de compresión y de elevación. El objetivo de este tratamiento es minimizar la inflamación, la hemorragia, el dolor y el metabolismo celular durante la fase aguda posterior a la lesión y optimizar el potencial para la posterior recuperación.

15

20

Dicho tratamiento inicial está seguido a menudo por una protección de los tejidos deseados mediante una inmovilización durante 1-3 semanas después de la lesión. La inmovilización aspira a permitir el inicio de la curación y que se produzca sin alteraciones, y también impide la reaparición de la lesión de la articulación, que a menudo da como resultado unos tiempos de recuperación más largos y puede tener efectos a largo plazo. Después de que haya comenzado la curación del tejido, normalmente a partir de las 3 semanas después de la lesión, se introduce una movilización controlada. A las 4-8 semanas después de la lesión, puede comenzar una rehabilitación vigorosa para recuperar la masa muscular y la función articular.

25

La reparación ortopédica de las lesiones graves a menudo se lleva a cabo tan pronto como remiten la inflamación aguda y la hemorragia de la lesión. Sin embargo, los médicos no tienen disponible actualmente un sistema o un método para diferenciar entre una lesión aguda que requiere un tratamiento invasivo y las lesiones que curarán lo suficiente sin dicho tratamiento.

30

Es particularmente importante la identificación de las lesiones que pueden dar como resultado un deterioro articular antes de que dicho deterioro comience. Actualmente, este tipo de información únicamente puede obtenerse mediante las imágenes de RMN de los componentes estructurales de la articulación para determinar si se están manteniendo unas medidas estructurales críticas, tales como el volumen del cartílago, o están experimentando una degeneración progresiva. Normalmente, la obtención de imágenes es necesaria a unos intervalos de aproximadamente 1-2 años después de la lesión. También puede usarse un ensayo de proteínas marcadoras en el líquido sinovial para detectar y monitorizar el deterioro de la articulación. Sin embargo, debido a que dichos ensayos con marcadores generalmente se basan en un número muy limitado de productos génicos, y la abundancia de los productos en el líquido puede ser muy variable, su capacidad predictiva tiende a estar muy limitada.

35

40

El documento US2013/178442 desvela un perfil de expresión génica con unos valores para los productos génicos que son expresados diferencialmente en los pacientes con lesiones de rodilla con una inflamación sinovial en comparación con los pacientes sin una inflamación sinovial (véase el párrafo [0006] y la Tab. 3). Se comparó el perfil de una patente con los perfiles obtenidos de pacientes con lesiones de rodilla que tenían una inflamación sinovial y aquellos que no, para determinar a qué grupo pertenece con más probabilidad el paciente (véase el párrafo [0010]).

45

50

Sumario de las realizaciones preferidas

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para la caracterización de la calidad de la respuesta de reparación después de una lesión en una articulación de un sujeto humano o veterinario. El método incluye la determinación de los niveles de expresión del ARNm de una pluralidad de genes expresados en una muestra de tejido tomada de una región intraarticular de la articulación, comprendiendo la pluralidad de genes al menos los genes indicados en la Tabla 1, en la Tabla 2 y en la Tabla 3, y el cálculo de una puntuación del índice de reparación sobre la base de los niveles de expresión del ARNm de estos genes, en el que el cálculo de la puntuación del índice de reparación comprende:

55

60

la comparación de los niveles de expresión del ARNm con los primeros niveles de expresión convencionales de la pluralidad de genes y los segundos niveles de expresión convencionales de la pluralidad de genes, en la que se sabe que los primeros niveles de expresión convencionales son indicativos de un perfil reparador y en la que se sabe que los segundos niveles de expresión convencionales son indicativos de un perfil no reparador;

65

la asignación de una subpuntuación para cada uno de la pluralidad de genes, en la que la subpuntuación es una medida del nivel de expresión del ARNm de ese gen con respecto al primer nivel de expresión habitual y al segundo

nivel de expresión habitual para ese gen, y la suma de las subpuntuaciones para obtener la puntuación del índice de reparación;

en el que la puntuación del índice de reparación es indicativa de la calidad del proceso de reparación, y en el que la puntuación del índice de reparación es indicativa de un perfil no reparador si la puntuación del índice de reparación es indicativa de un elevado nivel de expresión del ARNm de cada uno de la pluralidad de genes.

En una realización, los niveles de expresión del ARNm se determinan mediante el uso de un ensayo de PCR con transcriptasa inversa en tiempo real. La muestra de tejido puede incluir cartilago, membrana sinovial, tejido meniscal, revestimiento de la cápsula articular, ligamentos o combinaciones de al menos dos de estos materiales.

El cálculo de la puntuación del índice de reparación incluye la comparación de los niveles de expresión del ARNm del tejido del paciente con los primeros niveles de expresión convencionales de los genes y los segundos niveles de expresión convencionales de los genes, en el que los primeros niveles de expresión convencionales son indicativos de un perfil reparador y en el que los segundos niveles de expresión convencionales son indicativos de un perfil no reparador. La puntuación del índice de reparación se basa en los valores relativos de los niveles de expresión del ARNm del tejido del paciente, de los primeros niveles de expresión convencionales y de los segundos niveles de expresión convencionales.

Los primeros niveles de expresión convencionales pueden ser los niveles de expresión posteriores a la lesión en un ratón natural, y los segundos niveles de expresión convencionales pueden ser los niveles de expresión posteriores a la lesión en un ratón que carece de la sintasa de hialuronano 1. El método también puede incluir la aplicación de un factor de corrección para ajustar la abundancia relativa de los niveles murinos con respecto a los genes expresados en la muestra de tejido del paciente.

En otras realizaciones, la pluralidad de genes incluye al menos los genes indicados en la Tabla 4, en la Tabla 5 y en la Tabla 6, o al menos los genes indicados en la Tabla 7, en la Tabla 8 y en la Tabla 9. La pluralidad de genes también puede incluir los genes indicados en la Tabla 13, en la Tabla 14 y/o en la Tabla 15.

Otro aspecto de la presente invención proporciona una terapia de viscosuplementación con AH, cremas antiinflamatorias, geles antiinflamatorios o aerosoles, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), inyecciones de esteroides o comprimidos de esteroides para su uso en el tratamiento de una lesión en una articulación de un sujeto humano o veterinario, en el que se ha calculado que dicho sujeto tiene una puntuación del índice de reparación indicativa de un perfil no reparador mediante el método de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 incluye gráficos de barras que ilustran la abundancia relativa del ARNm para los 22 genes de la fibrosis incluidos en la Tabla 7.

La Figura 2 incluye gráficos de barras que ilustran la abundancia relativa del ARNm para los 22 genes de la reparación de heridas incluidos en la Tabla 8.

La Figura 3 incluye gráficos de barras que ilustran la abundancia relativa del ARNm para los 22 genes de la inflamación incluidos en la Tabla 9.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Definiciones

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado al comprendido habitualmente por el experto habitual en la materia a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, prevalecerá el presente documento, incluyendo las definiciones. A continuación se describen los métodos y los materiales preferidos, aunque pueden usarse unos métodos y unos materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o en las pruebas de la presente invención.

Debe interpretarse que los usos de los términos "un" y "uno/a" y "el/la" y las referencias similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones que siguen) cubren tanto el singular como el plural, salvo que se indique de otro modo en el presente documento o el contexto lo contradiga claramente. La enumeración de unos intervalos de valores en el presente documento pretende servir simplemente como un método abreviado para hacer referencia individualmente a cada valor por separado que está en el intervalo, salvo que se indique de otro modo en el presente documento, y cada valor por separado está incorporado en la memoria descriptiva como si se hubiera enumerado individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden llevarse a cabo en cualquier orden adecuado, salvo que se indique de otro modo en el presente documento o de otro modo el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o de un lenguaje de ejemplos (por ejemplo, "tales como", "por ejemplo") proporcionados en el presente documento pretende simplemente iluminar mejor la invención y no suponen una limitación sobre el ámbito de la invención, salvo que se

reivindique de otro modo. Ningún lenguaje de la memoria descriptiva debe ser interpretado como indicativo de cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

5 Según se usa en el presente documento, los términos “comprende(n)”, “incluye(n)”, “que tiene(n)”, “tiene(n)”, “puede(n)”, y las variantes de los mismos, pretende ser frases de transición con los extremos abiertos, términos o palabras que no excluyen la posibilidad de actos adicionales. La presente invención también contempla “que comprende”, “que consiste en” y “que consiste esencialmente en” las realizaciones o en los elementos presentados en el presente documento, tanto si se establecen de forma explícita como si no.

10 Método de determinación de la calidad de la respuesta de reparación después de la lesión articular

15 Con el fin de promover la comprensión de los principios de la invención, ahora se hará referencia a las realizaciones, algunas de las cuales están ilustradas en los dibujos, y se usará un lenguaje específico terminal para la descripción de las mismas. No obstante, se entenderá que con ello no se pretende ninguna limitación del ámbito de la invención. Se contempla cualquier alteración y modificación adicional en las realizaciones descritas, y cualquier aplicación adicional de los principios de la invención según se describe en el presente documento, como se le ocurriría normalmente al experto en la materia a la que se refiere la invención. En los análisis que siguen se divulgan diversas potenciales características o selecciones de los métodos de ensayo, de los métodos de análisis u otros aspectos. Debe entenderse que cada una de dichas características divulgadas puede ser combinada con las características generalizadas analizadas, para formar una realización divulgada de la presente invención.

20 Un aspecto de la presente invención proporciona un método para la generación de un índice de reparación que es indicativo de la calidad de la respuesta de reparación después de una lesión articular. La articulación puede ser cualquier articulación del cuerpo de un sujeto humano o veterinario que incluye, pero no se limita a, las articulaciones de la rodilla, del hombro, de la cadera, del codo o del tobillo, o una articulación de la mano, del pie o de la columna vertebral. El método incluye un análisis de la expresión génica de una muestra de tejido tomada del espacio intraarticular de la articulación.

25 En una realización, el método determina los cambios en el transcriptoma del tejido que contiene las células progenitoras estromales y multipotentes próximas al sitio de la lesión. Específicamente, la abundancia del transcrito de un conjunto de genes “fibroproliferativos” y “profibróticos” en dichos tejidos articulares es predictiva de la calidad del proceso de reparación a largo plazo. Dichos genes incluyen los genes de las rutas de la fibrosis, de las citocinas y/o del NFkB que están implicados en la fibrosis, en la curación de heridas y en la inflamación. En un modelo murino, la determinación de los niveles de expresión de dichos genes tan pronto como 4 semanas después de la lesión es predictiva de la calidad de la reparación articular que puede esperarse.

30 En una realización, la muestra de tejido se obtiene de la región intraarticular. Según se usa en el presente documento el término “intraarticular” se refiere al espacio interior de una articulación entre dos huesos, específicamente a la porción de la articulación contenida por la cápsula articular. La muestra puede incluir cartílago, membrana sinovial, tejido meniscal comprimido, revestimiento de la cápsula articular, ligamentos o combinaciones de al menos dos de estos materiales.

35 En ciertas realizaciones, el sujeto es un sujeto humano y la muestra de tejido se obtiene entre 4 semanas y 20 semanas, entre 4 semanas y 18 semanas, entre 4 semanas y 12 semanas o entre 6 semanas y 10 semanas después de la lesión. En otras realizaciones se obtienen múltiples muestras de tejido, cada una en un momento diferente después de la lesión. Dicho procedimiento permite la monitorización de la calidad de la respuesta de reparación con el transcurso del tiempo. Por ejemplo, la calidad de la curación natural de la articulación o la respuesta de la lesión a un tratamiento en particular puede ser determinada mediante la observación de los cambios en la expresión génica con el tiempo. Por ejemplo, la muestra de tejido puede obtenerse durante una primera evaluación artroscópica (o articulación abierta) de la lesión, en ciertos casos, dependiendo de las preferencias de los cirujanos, podría obtenerse una segunda muestra en un momento posterior (tal como en una cirugía o en una segunda evaluación artroscópica)

40 El análisis de la expresión génica puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la materia. Algunos métodos adecuados para dicho análisis incluyen, pero no se limitan a, una inmunotransferencia Northern, un ensayo de protección con nucleasa, una PCR con hibridación *in situ* y en tiempo real. En una realización preferida, la expresión génica se mide mediante la cuantificación del ARNm usando una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (RT²-PCR). Por ejemplo, los niveles del ARNm pueden medirse usando los productos disponibles comercialmente, tales como el RT² Profiler PCR Array, disponible en Qiagen, Inc. (Valencia, Calif.)

45 En varias realizaciones se miden los niveles de expresión de los genes asociados con la fibrosis, con la curación de heridas y con la inflamación. En el análisis de la expresión génica se determinan al menos los genes indicados en la Tabla 1 (genes de la fibrosis), en la Tabla 2 (genes de la curación de heridas) y en la Tabla 3 (genes de la inflamación). En otra realización, también se determinan al menos los genes indicados en la Tabla 4, en la Tabla 5 y en la Tabla 6. En otra realización más, también se determinan al menos los genes indicados en la Tabla 7, en la Tabla 8 y en la Tabla 9. En otras realizaciones, también se determinan los niveles de expresión de al menos algunos de los genes

indicados en las Tablas 13, 14 y 15. Por ejemplo, también pueden determinarse 10, 20, 40, 50, 60 o 65 de los genes incluidos en la Tabla 13, y/o 5, 10 o 15 de los genes indicados en la Tabla 14, en el análisis de la expresión génica.

En ciertas realizaciones, se usan los niveles de expresión de los genes analizados más arriba para el cálculo de una puntuación del índice de reparación, que es indicativo de la calidad del proceso de reparación después de una lesión articular en un sujeto humano o veterinario. Por ejemplo, el índice de reparación puede ser indicativo de si la lesión muestra una respuesta de curación de heridas que da como resultado la reparación de la lesión (perfil reparador) de una respuesta aberrante que da lugar a una degeneración de la articulación, a una fibrosis y/o a una inflamación crónica (perfil no reparador.)

En una realización se comparan los niveles de expresión de los genes de una muestra de tejido de una lesión articular de un paciente con los niveles de expresión convencionales, por ejemplo, los niveles de expresión sin lesión, para los correspondientes genes de la misma ubicación de tejido en la misma especie o en una diferente. Por ejemplo, los niveles de expresión convencionales pueden ser los niveles de expresión génica conocidos por ser indicativos de un perfil reparador, en otra realización, se comparan los niveles de expresión de la muestra del paciente con los niveles de expresión convencionales que son indicativos de un perfil no reparador, en otra realización más, se comparan los niveles de expresión del paciente con los niveles de expresión convencionales indicativos tanto de perfiles reparadores como no reparadores. Cuando se requiere una cuantificación adicional de la puntuación del índice de reparación, pueden incluirse patrones de adicionales para la comparación con los niveles de expresión del paciente.

A continuación se describe un ejemplo del protocolo para el cálculo de una puntuación del índice de reparación únicamente con fines ilustrativos. No se pretende que los métodos divulgados estén limitados a esta realización ilustrativa.

Se determinan los niveles de expresión de los genes requeridos seleccionados entre aquellos indicados en las Tablas 1-19 y 13-15 en ratones naturales (WT) y en ratones que carecen de la sintasa de hialuronano 1 (Has1^{-/-}, MGI: 106590) aproximadamente cuatro semanas después de la lesión del cartílago en la articulación de la rodilla en este modelo de lesión, los ratones WT muestran unas respuestas clásicas de curación de heridas en tejidos blandos, que dan como resultado una respuesta de reparación. En comparación, los ratones Has1^{-/-} muestran unas respuestas curación de heridas aberrantes, que dan lugar a una fibrosis, una inflamación crónica y una patología artrósica (por ejemplo, degeneración del cartílago y formación de osteofitos). Los análisis de la matriz génica específica de ruta en combinación con la morfología macroscópica, la inmunoquímica, confirman la respuesta de curación en los ratones WT, pero una fibrosis crónica y un estado inflamatorio en las articulaciones de los ratones Has1^{-/-}. A las 4 semanas después de la lesión en un modelo murino, la abundancia del transcrito de estos genes en dichos tejidos articulares es predictiva de la calidad del proceso de reparación a largo plazo.

Los niveles de expresión de los ratones WT (reparación) y de los ratones Has1^{-/-} (sin reparación) se muestran en las Tablas 1-9 para los 88 genes implicados en la fibrosis, en la curación de heridas o en la inflamación. Estas tablas también muestran la proporción entre los niveles de expresión de estos genes en los ratones WT y en los ratones Has1^{-/-}. Todos los genes de las Tablas 1-9 se muestran regulados por aumento al menos 7,8 veces en los ratones Has1^{-/-} en comparación con los ratones WT. Los genes adicionales están indicados en la Tabla 13 están regulados por aumento aproximadamente 3-8 veces en los ratones Has1^{-/-} en comparación con los ratones WT. Los genes indicados en la Tabla 14 están regulados por disminución aproximadamente 3-8 veces en los ratones Has1^{-/-} en comparación con los ratones WT.

La Figura 1 ilustra la abundancia relativa del ARNm para los 22 genes de la fibrosis incluidos en la Tabla 7. Aquí se muestra que la expresión en los ratones Has1^{-/-} ha progresado hasta más de 100 veces. La Figura 2 ilustra la abundancia relativa del ARNm para los 22 genes de la reparación de heridas incluidos en la Tabla 8. Para estos genes, se muestra que la expresión en los ratones Has1^{-/-} ha progresado hasta más de 200 veces. La Figura 3 ilustra la abundancia relativa del ARNm para los 22 genes de la inflamación incluidos en la Tabla 8. Para estos genes, se muestra que la expresión en los ratones Has1^{-/-} ha progresado hasta justo por debajo de 400 veces.

En una realización, se miden los niveles de expresión de varios genes relacionados con la fibrosis, la curación de heridas y la inflamación que tienen unos niveles de expresión similares los ratones WT y Has1^{-/-}. Por ejemplo, puede considerarse que dichos genes murinos "no reactivos" son unos genes que están regulados por aumento o por disminución menos de 3 veces en los ratones Has1^{-/-} en comparación con sus niveles en los ratones WT. La Tabla 10 indica los niveles de expresión de 8 de dichos genes.

Los niveles de expresión de los genes murinos no reactivos, por ejemplo, los genes que no responden de los ratones WT se comparan después con los niveles de expresión de los correspondientes genes en la muestra de tejido del paciente. Se calcula una proporción génica promedio. Por ejemplo, dicho cálculo para la ruta de la fibrosis está ilustrado en la Tabla 11. Esta proporción puede usarse como un factor de corrección murino/humano para normalizar las diferencias en el nivel de expresión entre los genes humanos y los genes murinos. Los niveles de expresión de los genes murinos de los WT y de los Has1^{-/-} (por ejemplo, aquellos genes indicados en las Tablas 1-9, 13-15) están multiplicados por el factor de corrección para generar un intervalo humano equivalente para cada gen.

Puede calcularse una puntuación del índice de reparación, por ejemplo, mediante la asignación de una puntuación de cero al valor inferior del intervalo humano para cada gen y una puntuación de 10 para el valor superior del intervalo humano para cada gen, puntuándose cada valor intermedio según sea apropiado en esta escala. Se asigna una puntuación para cada uno de los genes medidos en la muestra del paciente, por ejemplo, para cada uno de los 48 genes indicados en las Tablas 4, 5 y 6, y las puntuaciones se añaden para dar la puntuación del índice de reparación. Esta puntuación total variará entre cero y 160 para cada ruta de 16 genes, y entre cero y 480 para las tres rutas combinadas. Una puntuación de cero será indicativa de una reparación muy buena, y una puntuación de 160 (o de 480) de una reparación muy mala. La Tabla 12 ilustra el cálculo del índice de reparación para un paciente humano sobre la base de los niveles de expresión de la lista de seis genes de la Tabla 1.

Métodos de tratamiento

Otro aspecto de la presente invención proporciona una terapia de viscosuplementación con AH, cremas antiinflamatorias, geles antiinflamatorios o aerosoles, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), inyecciones de esteroides o comprimidos de esteroides para su uso en el tratamiento de una lesión de una articulación de un sujeto humano o veterinario en la que se ha calculado que dicho sujeto tiene una puntuación del índice de reparación indicativa de un perfil no reparador mediante el método de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Protocolo usado para la obtención de muestras tisulares para su análisis

Las muestras para su uso en la determinación de un índice de reparación para una articulación lesionada de un paciente se obtienen normalmente a partir de uno o más de los siguientes: cartílago, membrana sinovial, tejidos meniscales, revestimiento de la cápsula articular y ligamentos (incluyendo los ligamentos ACL, PCL y perimeniscales). Las muestras se obtienen habitualmente durante la primera artroscopia posterior a la lesión. En algunos casos, cuando la magnitud de la implicación de los tejidos blandos ha sido determinada mediante imágenes de RMN u otras modalidades de obtención de imágenes, se toman biopsias durante la reparación quirúrgica. El tejido (normalmente 50 miligramos de peso en húmedo) próximo al sitio de la lesión, tal como la membrana sinovial perimeniscal en el caso de un desgarramiento meniscal, se coloca inmediatamente en un RNALater (Qiagen Inc.) y se almacena a 4°C para la estabilización del ARN. El ARN (al menos 2 microgramos) se analiza con matrices Qiagen RT² Profiler PCR para evaluar los componentes de las rutas de la fibrosis, de la curación de heridas y de la inflamación. También pueden usarse matrices equivalentes de otros proveedores si se obtienen múltiples biopsias, puede generarse un índice a partir de cada una para evaluar la eficacia de las terapias que se están usando.

Ejemplo 2 - Análisis del ensayo génico de un modelo de lesión del cartílago en ratones

La lesión del cartílago en la articulación de la rodilla de ratones naturales (C57BL6) y de ratones que carecen de la sintasa de hialuronano 1 (Has1^{-/-}, MGI; 106590) se analiza como se describe a continuación. Se abre el espacio de la articulación de la rodilla y con un escalpelo se crea una herida no hemorrágica de espesor parcial en la superficie del surco rotuliano femoral. Después de lavar la herida, la articulación se cierra quirúrgicamente y los ratones se enjaulan con actividad libre con comida y agua ad libitum.

Se diseccionan las rodillas (sin piel ni músculo) de los ratones los días 0, 3, 7, 14 y 28 después de la cirugía. El estado de reparación/curación se evalúa mediante una morfología macroscópica, una histología y una inmunohistoquímica con un grupo de anticuerpos contra las respuestas innatas de reparación de la matriz e inflamatorias, además, se usa un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo en tiempo real para cuantificar la abundancia de los ARNm en las placas de las matrices de la fibrosis, la citocina común y el NPkB (Qiagen Inc., nº de producto PAMM-225Z, PAMM-021Z y PAMM-120Z).

Se evalúan los datos obtenidos a partir de la morfología macroscópica, de la histología y de la inmunohistoquímica de los ratones naturales y de los Has1^{-/-} en cada punto temporal. Los ratones naturales muestran una fase inflamatoria temporal y una fase fibrogénica que es más evidente en los tejidos ricos en células estromales/progenitoras adyacentes al sitio de la lesión del cartílago. En momentos posteriores, esta respuesta temprana se detiene y la recuperación de la lesión inicial es sustancial. Por el contrario, para los ratones Has1^{-/-}, la histopatología de los tejidos blandos después de la lesión no se detiene. Más bien, se transforma en respuestas fibro-proliferativas adicionales y los clásicos cambios artrósicos que incluyen la pérdida del cartílago de los sitios inicialmente no lesionados, tales como las superficies tibial y rotuliana, y el desarrollo de osteofitos en los aspectos lateral y medial del surco femoral.

En resumen, según se evalúa mediante este grupo de métodos, la respuesta de reparación es muy eficaz en los ratones naturales, pero está esencialmente ausente en los ratones Has1^{-/-}. Los análisis de la matriz RT² PCR para los componentes de las rutas de la fibrosis, de la curación de heridas y de la inflamación revelan que los ratones naturales y los Has1^{-/-} muestran una expresión de los geles notablemente diferente en la totalidad de las 3 rutas. Se eligen 50 genes de cada ruta que se encuentra que discriminan mejor entre los 2 genotipos para su uso en la generación de un índice de reparación:

En análisis paralelos del ARNm de tejidos particulares murinos y humanos, los modelos murino y humano y muestran rutinariamente unos valores similares para la abundancia de transcritos para los genes de interés. Los valores de la abundancia para las muestras tanto murinas como humanas están controlados internamente frente a: el gen constitutivo, la deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato (GAPDH).) Esto permite la estandarización de los análisis de la expresión génica humana frente a los valores murinos obtenidos en las mismas condiciones de ensayo.

5

	Gen	Reparación	Sin reparación	NR/R
1	<i>Inhbe</i>	0,1	9,5	105,0
2	<i>Bmp1</i>	9,0	894,9	99,2
3	<i>Ifng</i>	0,2	17,1	86,4
4	<i>Fbns</i>	0,9	78,8	84,6
5	<i>Il11</i>	0,09	8,54	96,7
6	<i>Edn1</i>	0,6	22,3	39,0

10 Tabla 1: abundancia del transcrito – ruta de la fibrosis: conjunto de genes 1

	Gen	Reparación	Sin reparación	NR/R
1	<i>Il2</i>	0,1	17,2	207,4
2	<i>Csf2</i>	0,0	7,1	206,7
3	<i>Mmp1a</i>	0,1	17,2	190,8
4	<i>Plg</i>	0,1	8,9	142,4
5	<i>Fgf10</i>	0,2	18,5	92,7
6	<i>Il6</i>	0,4	18,3	51,3

15 Tabla 2: abundancia del transcrito – ruta de la curación de heridas: conjunto de genes 1

15

	Gen	Reparación	Sin reparación	NR/R
1	<i>Snap25</i>	0,06	15,23	244,8
2	<i>Il20</i>	0,06	12,21	199,2
3	<i>Cxcl3</i>	0,08	15,01	180,3
4	<i>Il21</i>	0,06	9,31	149,6
5	<i>Il3</i>	0,06	11,08	177,8
6	<i>Ifnb1</i>	0,06	22,61	363,4

Tabla 3: abundancia del transcrito – ruta de la inflamación: conjunto de genes 1

	Gen	Reparación	Sin reparación	NR/R
1	<i>Inhbe</i>	0,1	9,5	105,0
2	<i>Bmp1</i>	9,0	894,9	99,2
3	<i>Ifng</i>	0,2	17,1	86,4
4	<i>Fbns</i>	0,9	78,8	84,6
5	<i>Il11</i>	0,09	8,54	96,7
6	<i>Edn1</i>	0,6	22,3	39,0
7	<i>Ccl3</i>	0,9	25,9	30,0
8	<i>Col3a</i>	1436	27331	19,0
9	<i>Il13ra2</i>	1,3	21,0	16,1
10	<i>Mmp3</i>	14,7	218,8	14,9
11	<i>Ccl12</i>	2,0	28,3	14,0
12	<i>Fas1</i>	0,7	10,1	14,8

ES 2 756 173 T3

13	<i>Tgfb1</i>	1,2	17,1	14,0
14	<i>Cav1</i>	25,5	399,3	14,7
15	<i>Ccl12</i>	2,0	28,3	14,0
16	<i>Ccl11</i>	1,3	14,7	11,8

Tabla 4: abundancia del transcrito, ruta de la fibrosis, conjunto de genes 2

	Gen	Reparación	Sin reparación	NR/R
1	<i>Il2</i>	0,1	17,2	207,4
2	<i>Csf2</i>	0,0	7,1	205,7
3	<i>Mmp1a</i>	0,1	17,2	190,8
4	<i>Plg</i>	0,1	9,9	142,4
5	<i>Fgf10</i>	0,2	18,5	82,7
6	<i>Il8</i>	0,4	18,3	51,3
7	<i>Il10</i>	0,8	30,8	39,9
8	<i>Mif</i>	64,7	1893,3	34,9
9	<i>Mmp2</i>	152,2	3183,6	20,9
10	<i>EGF</i>	0,7	13,8	19,8
11	<i>Itgb8</i>	0,6	10,3	17,5
12	<i>Ptgs2</i>	1,2	21,2	17,5
13	<i>Plat</i>	1,8	27,4	15,5
14	<i>Itgb6</i>	2,1	28,6	13,6
15	<i>Timp1</i>	0,1	1,3	13,4
16	<i>Csf3</i>	0,2	2,6	12,6

Tabla 5: abundancia del transcrito, ruta de la curación de heridas, conjunto de genes 2

	Gen	Reparación	Sin reparación	NR/R
1	<i>Snap25</i>	0,06	15,23	244,8
2	<i>Il20</i>	0,06	12,21	196,2
3	<i>Cxcl3</i>	0,08	15,01	180,3
4	<i>Il21</i>	0,06	9,31	149,6
5	<i>Il3</i>	0,06	11,06	177,6
6	<i>Il6</i>	0,06	22,81	363,4
7	<i>Csf22</i>	0,1	8,8	83,3
8	<i>Il12b</i>	0,2	13,6	71,7
9	<i>Cla</i>	0,2	3,9	22,6
10	<i>Cxcl1</i>	0,3	11,2	34,9
11	<i>Il24</i>	0,4	16,1	37,9
12	<i>Lif</i>	0,5	17,9	36,6
13	<i>FasL</i>	1,7	28,6	17,2
14	<i>Il19</i>	10,5	116,9	11,2
15	<i>Il16</i>	3,7	50,2	13,5
16	<i>Egr2</i>	8,1	85,0	10,5

ES 2 756 173 T3

Tabla 6: abundancia del transcrito, ruta de la inflamación, conjunto de genes 2

	Gen	Reparación	Sin reparación	NR/R
1	<i>Intbe</i>	0,1	6,5	105,0
2	<i>Bmp1</i>	9,0	894,9	99,2
3	<i>Ifng</i>	0,2	17,1	86,4
4	<i>Fhrs</i>	0,9	78,6	84,6
5	<i>Il11</i>	0,09	6,54	96,7
6	<i>Edn1</i>	0,6	22,3	39,0
7	<i>Ccl3</i>	0,9	25,9	30,0
8	<i>Ccl3a</i>	1436	27331	19,0
9	<i>Il13ra2</i>	1,3	21,0	16,1
10	<i>Mmp3</i>	14,7	219,8	14,9
11	<i>Ccl12</i>	2,0	28,3	14,0
12	<i>Fas1</i>	0,7	10,1	14,8
13	<i>Tgfb1</i>	1,2	17,1	14,0
14	<i>Cav1</i>	28,5	389,3	14,7
15	<i>Ccl12</i>	2,0	28,3	14,0
16	<i>Ccl11</i>	1,3	14,7	11,8
17	<i>Snai1</i>	1,5	16,7	11,4
18	<i>tgfb2</i>	4,0	44,7	11,2
19	<i>Ctgf</i>	585,0	6138,4	10,5
20	<i>Bmp7</i>	0,8	9,0	10,7
21	<i>tgfb3</i>	6,2	64,7	10,5
22	<i>Timp3</i>	36,0	380,2	10,6

Tabla 7: abundancia del transcrito, ruta de la fibrosis, conjunto de genes 3

	Gen	Reparación	Sin reparación	NR/R
1	<i>Il2</i>	0,1	17,2	207,4
2	<i>Csf2</i>	0,0	7,1	206,7
3	<i>Mmp1a</i>	0,1	17,2	190,8
4	<i>Plg</i>	0,1	8,9	142,4
5	<i>Fgf10</i>	0,2	18,5	82,7
6	<i>Il6</i>	0,4	18,3	51,3
7	<i>Il10</i>	0,9	30,5	39,9
8	<i>Mif</i>	54,7	1893,3	34,6

ES 2 756 173 T3

9	<i>Mmp2</i>	152,2	3193,6	20,9
10	<i>EGF</i>	0,7	13,8	19,5
11	<i>Itgb8</i>	0,6	10,3	17,5
12	<i>Ptgs2</i>	1,2	21,2	17,5
13	<i>Plat</i>	1,8	27,4	15,5
14	<i>Itgb6</i>	2,1	28,6	13,8
15	<i>Timp1</i>	0,1	1,3	13,4
16	<i>Csf3</i>	0,2	2,6	12,6
17	<i>Tspd2</i>	55,8	675,4	12,1
18	<i>Itga3</i>	0,7	8,0	12,0
19	<i>Itgb5</i>	18,7	210,7	10,7
20	<i>Vcan V1**</i>	0,1	0,5	9,0
21	<i>HGF</i>	8,4	72,0	8,6
22	<i>VegfA</i>	6,0	47,0	7,8

Tabla 8: abundancia del transcrito, ruta de la curación de heridas, conjunto de genes 3

	Gen	Reparación	Sin reparación	NR/R
1	<i>Snap25</i>	0,06	15,23	244,8
2	<i>Il20</i>	0,06	12,21	198,2
3	<i>Cxcl3</i>	0,08	15,01	188,3
4	<i>Il21</i>	0,06	9,31	149,6
5	<i>Il3</i>	0,06	11,06	177,8
6	<i>Il1b1</i>	0,06	22,61	363,4
7	<i>Ccl22</i>	0,1	8,8	83,3
8	<i>Il12b</i>	0,2	13,6	71,7
9	<i>C4a</i>	0,2	3,9	22,6
10	<i>Cxcl1</i>	0,3	11,2	34,9
11	<i>Il24</i>	0,4	16,1	37,9
12	<i>Lif</i>	0,5	17,9	36,6
13	<i>FasL</i>	1,7	28,6	17,2
14	<i>Il18</i>	10,5	116,9	11,2
15	<i>Il16</i>	3,7	50,2	13,5
16	<i>Egr2</i>	8,1	85,0	10,5
17	<i>Bcl2a1a</i>	5,2	54,8	10,5
18	<i>Egr2</i>	8,1	85,0	10,5
19	<i>Bcl2a1a</i>	5,2	54,8	10,5
20	<i>Ifna4</i>	0,1	17,7	9,6
21	<i>IL1a</i>	7,2	69,0	9,6
22	<i>Adm</i>	0,5	4,2	9,0

Tabla 9: abundancia del transcrito, ruta de la inflamación, conjunto de genes 3

Gen	Reparación	Sin reparación	NR/R
<i>Akt1</i>	69,0	113,1	1,6
<i>Csf2rb</i>	32,7	67,0	2,0
<i>Irf1</i>	78,1	163,1	2,1
<i>Ltb</i>	20,3	33,9	1,7
<i>Stat1</i>	100,2	171,2	1,7
<i>Stat3</i>	18,3	50,6	2,8
<i>Tnf</i>	7,6	17,3	2,3
<i>Tnfrsf1b</i>	23,5	44,7	1,9

Tabla 10: conjunto de genes de normalización 1

	Datos del paciente A para los genes que no responden	Paciente A/ murino para los genes que no responden
<i>Akt1</i>	31	0,45
<i>Csf2rb</i>	25	0,76
<i>Irf1</i>	37	0,47
<i>Ltb</i>	16	0,8
<i>Stat1</i>	45	0,45
<i>Stat3</i>	5,0	0,28
<i>Tnf</i>	2,1	0,28
<i>Tnfrsf1b</i>	18	0,75
Proporción promedio		0,53

Tabla 11: cálculo del índice de la ruta de la fibrosis: proporción de genes que no responden

	Gen	Abundancia del transcrito, ruta de la fibrosis (murino) Reparación	Abundancia del transcrito, ruta de la fibrosis (murino) Sin reparación	Abundancia del transcrito, ruta de la fibrosis (humano) Reparación	Abundancia del transcrito, ruta de la fibrosis (humano) Sin reparación	Paciente A Abundancia del transcrito, ruta de la fibrosis	Paciente A Puntuación del índice
1	<i>Inhbe</i>	0,1	6,5	0,053	3,4	4,6	10
2	<i>Bmp1</i>	9,0	894,9	4,7	464	261	6
3	<i>Ifng</i>	0,3	17,1	0,12	9,1	7,9	8
4	<i>Fbns</i>	0,9	78,3	0,47	42	29	5
5	<i>Il11</i>	0,09	3,54	0,048	4,8	4,3	9
6	<i>Edn1</i>	0,8	22,3	0,34	13,2	3,6	3
	Puntuación total						41

Tabla 12: cálculo del índice de la ruta de la fibrosis para un paciente humano

	Gen		Gen
1	<i>Adm</i>	32	<i>Serpine1</i>
2	<i>Birc2</i>	33	<i>Serpinh1</i>
3	<i>Birc3</i>	34	<i>Smad2</i>
4	<i>Ccl12</i>	35	<i>Smad3</i>
5	<i>Ccl5</i>	36	<i>Smad4</i>
6	<i>Ccnd1</i>	37	<i>Smad6</i>
7	<i>Ccr5</i>	38	<i>Smad7</i>
8	<i>Cd80</i>	39	<i>Stat1</i>
9	<i>Egfr</i>	40	<i>Map2k6</i>
10	<i>F3</i>	41	<i>Myc</i>
11	<i>F8</i>	42	<i>Nfkb1</i>
12	<i>Gadd45b</i>	43	<i>Nqo1</i>
13	<i>Il1r2</i>	44	<i>Relb</i>
14	<i>Il1rn</i>	45	<i>Sele</i>
15	<i>Il2ra</i>	46	<i>Sod2</i>
16	<i>Il15</i>	47	<i>Stat5b</i>
17	<i>Il18</i>	48	<i>Tnfsf10</i>
18	<i>Il18</i>	49	<i>Agt</i>
19	<i>Il24</i>	50	<i>Ccr2</i>
20	<i>Il27</i>	51	<i>Cebpb</i>
21	<i>Inhba</i>	52	<i>Cxcr4</i>
22	<i>Lefty1</i>	53	<i>Itgb3</i>
23	<i>Ltb</i>	54	<i>Jun</i>
24	<i>Tnfsf13</i>	55	<i>Ltbp1</i>
25	<i>Agt</i>	56	<i>Mmp9</i>
26	<i>Ccr2</i>	57	<i>Plau</i>
27	<i>Cebpb</i>	58	<i>Serpine1</i>
28	<i>Cxcr4</i>	59	<i>Serpinh1</i>
29	<i>Eng</i>	60	<i>Smad2</i>
30	<i>Plau</i>	61	<i>Smad3</i>
31	<i>Serpina1a</i>	62	<i>Smad6</i>
		63	<i>Smad7</i>
		64	<i>Stat1</i>
		65	<i>Timp4</i>

Tabla 13: genes adicionales incluidos en las rutas de la fibrosis, de la curación de heridas o de la inflamación - conjunto 1

	Gen
1	<i>Csf2</i>
2	<i>Il4</i>
3	<i>Ins2</i>
4	<i>Bmp8b</i>
5	<i>Ctf2</i>
6	<i>Gdf15</i>
7	<i>Ifna2</i>
8	<i>Il13</i>
9	<i>Il17c</i>
10	<i>Il25</i>
11	<i>Il9</i>
12	<i>Tnfsf18</i>
13	<i>Tnfsf4</i>
14	<i>Il13</i>
15	<i>Il4</i>

Tabla 14: genes adicionales incluidos en las rutas de la fibrosis, de la curación de heridas o de la inflamación - conjunto 2

	Gen
1	Acan
2	Ambp
3	Col1a1
4	Col1a2
5	Col2a1
6	Col3a1
7	Has1
8	Has2
9	Has3
10	Itih1
11	Itih2
12	Stab2
13	Tnfaip6
14	Vcan

5 Tabla 15: genes de la matriz extracelular y asociados a la red de hialuronano relacionados con las rutas de la fibrosis, de la curación de heridas o de la inflamación

REIVINDICACIONES

1. Un método para la clasificación de la calidad de una respuesta de reparación después de una lesión en una articulación de un sujeto humano o veterinario, que comprende:
- 5 la determinación de los niveles de expresión del ARNm de una pluralidad de genes expresados en una muestra de tejido tomada de una región intraarticular de la articulación, comprendiendo la pluralidad de genes al menos los genes indicados en la TABLA 1, en la TABLA 2 y en la TABLA 3; y
- 10 el cálculo de una puntuación del índice de reparación sobre la base de los niveles de expresión del ARNm de la pluralidad de genes,
- en el que el cálculo de la puntuación del índice de reparación comprende:
- 15 la comparación de los niveles de expresión del ARNm con los primeros niveles de expresión convencionales de la pluralidad de genes y los segundos niveles de expresión convencionales de la pluralidad de genes, en el que se sabe que los primeros niveles de expresión convencionales son indicativos de un perfil reparador y en el que se sabe que los segundos niveles de expresión convencionales son indicativos de un perfil no reparador;
- 20 la asignación de una subpuntuación para cada uno de la pluralidad de genes, en el que la subpuntuación es una medida del nivel de expresión del ARNm de ese gen con respecto al primer nivel de expresión habitual y al segundo nivel de expresión habitual para ese gen, y la suma de las subpuntuaciones para obtener la puntuación del índice de reparación;
- en el que la puntuación del índice de reparación es indicativa de la calidad del proceso de reparación, y en el que la puntuación del índice de reparación es indicativa de un perfil no reparador si la puntuación del índice de reparación es indicativa de un elevado nivel de expresión del ARNm de cada uno de la pluralidad de genes.
2. El método de la reivindicación 1, en el que los primeros niveles de expresión convencionales son los niveles de expresión posteriores a la lesión de un ratón natural, y en el que los segundos niveles de expresión convencionales son los niveles de expresión posteriores a la lesión de un ratón que carece de la sintasa de hialuronano 1.
3. El método de la reivindicación 2, que comprende adicionalmente la aplicación de un factor de corrección para ajustar la abundancia relativa de los primeros y de los segundos niveles de expresión con respecto a los genes expresados en la muestra de tejido, en el que el factor de corrección se calcula como una proporción génica promedio entre los niveles de expresión murinos y los niveles de expresión de los correspondientes genes en el sujeto humano o veterinario, y los niveles de expresión de los genes murinos se multiplican por el factor de corrección para generar un intervalo equivalente para el sujeto humano o veterinario para cada gen.
4. El método de la reivindicación 2, en el que los primeros niveles de expresión convencionales y los segundos niveles de expresión convencionales son los niveles de expresión medidos entre 2 semanas y 4 semanas después de la lesión.
5. El método de la reivindicación 1, en el que la pluralidad de genes comprende al menos los genes indicados en la TABLA 4, en la TABLA 5 y en la TABLA 6 o al menos los genes indicados en la TABLA 7, en la TABLA 8 y en la TABLA 9.
6. El método de la reivindicación 5, en el que la pluralidad de genes comprende adicionalmente los genes indicados en la TABLA 13 o en la TABLA 14 o en la TABLA 15.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la muestra de tejido comprende material seleccionado entre el grupo que consiste en cartílago, membrana sinovial, tejido meniscal comprimido, revestimiento de la cápsula articular, ligamentos y combinaciones de al menos dos de estos materiales, o en el que la determinación de los niveles de expresión del ARNm comprende la realización de un ensayo de la PCR con transcriptasa inversa en tiempo real.
8. Terapia de viscosuplementación con AH, cremas antiinflamatorias, geles antiinflamatorios o aerosoles, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), inyecciones de esteroides o comprimidos de esteroides para su uso en el tratamiento de una lesión de una articulación de un sujeto humano o veterinario en el que se ha calculado que dicho sujeto tiene una puntuación del índice de reparación indicativa de un perfil no reparador mediante el método según se define en la reivindicación 1.
9. Terapia de viscosuplementación con AH, cremas antiinflamatorias, geles antiinflamatorios o aerosoles, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), inyecciones de esteroides o comprimidos de esteroides para su uso según la reivindicación 8, en la que la muestra de tejido comprende material seleccionado entre el grupo que consiste en cartílago, membrana sinovial, tejido meniscal, revestimiento de la cápsula articular, ligamentos y combinaciones de al menos dos de estos materiales.
10. Terapia de viscosuplementación con AH, cremas antiinflamatorias, geles antiinflamatorios o aerosoles, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), inyecciones de esteroides o comprimidos de esteroides para su uso según la reivindicación 8 o 9, en la que el sujeto es un sujeto humano y en la que los niveles de expresión del ARNm se

determinan entre 4 semanas y 12 semanas después de la lesión.

- 5 11. Terapia de viscosuplementación con AH, cremas antiinflamatorias, geles antiinflamatorios o aerosoles, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), inyecciones de esteroides o comprimidos de esteroides para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que la pluralidad de genes comprende al menos los genes indicados en la TABLA 4, en la TABLA 5 y en la TABLA 6 o al menos los genes indicados en la TABLA 7, en la TABLA 8 y en la TABLA 9.
- 10 12. Terapia de viscosuplementación con AH, cremas antiinflamatorias, geles antiinflamatorios o aerosoles, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), inyecciones de esteroides o comprimidos de esteroides para su uso según la reivindicación 11, en la que la pluralidad de genes comprende adicionalmente los genes indicados en la TABLA 13 o en la TABLA 14 o en la TABLA 15.

FIGURA 1

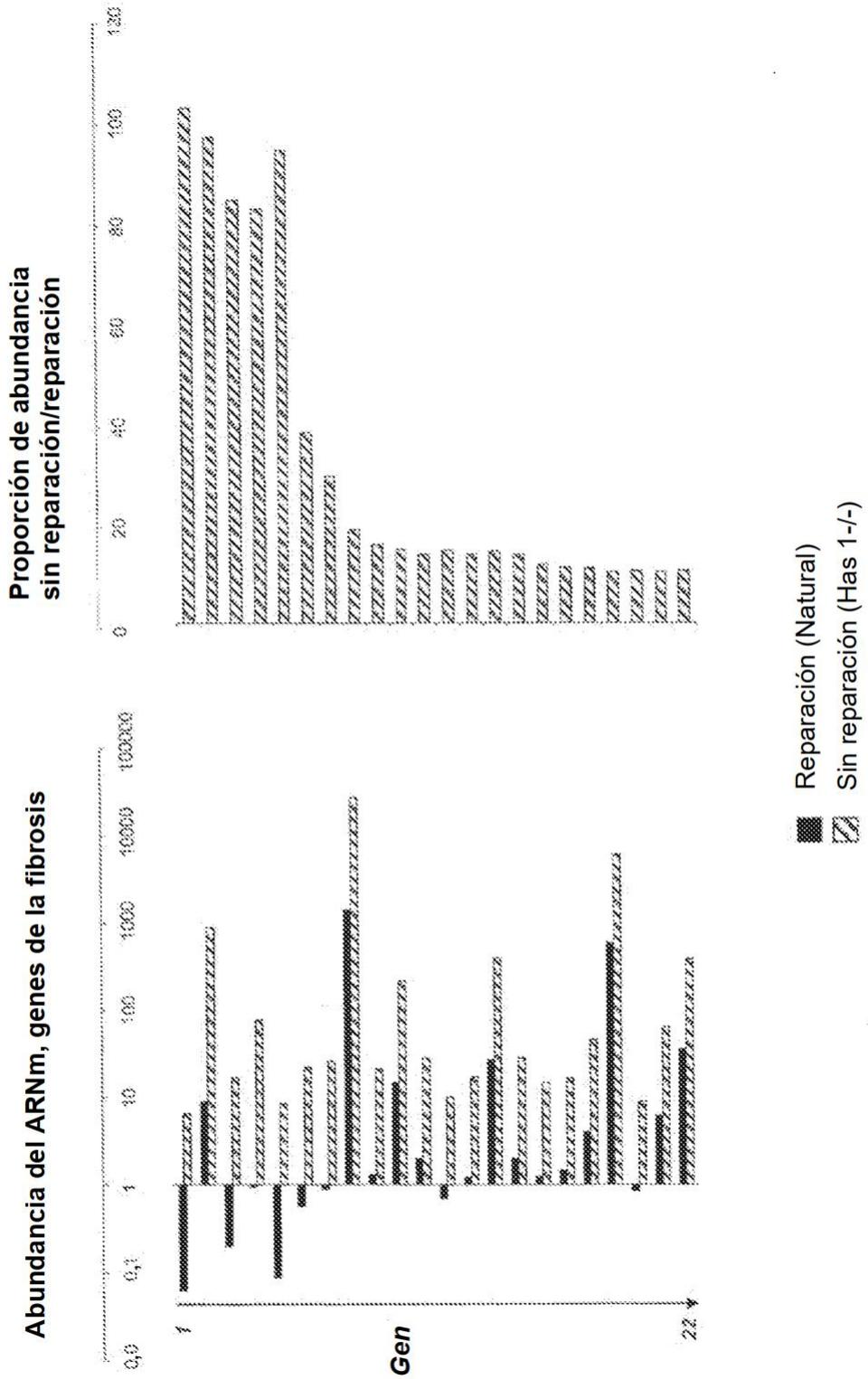


FIGURA 2

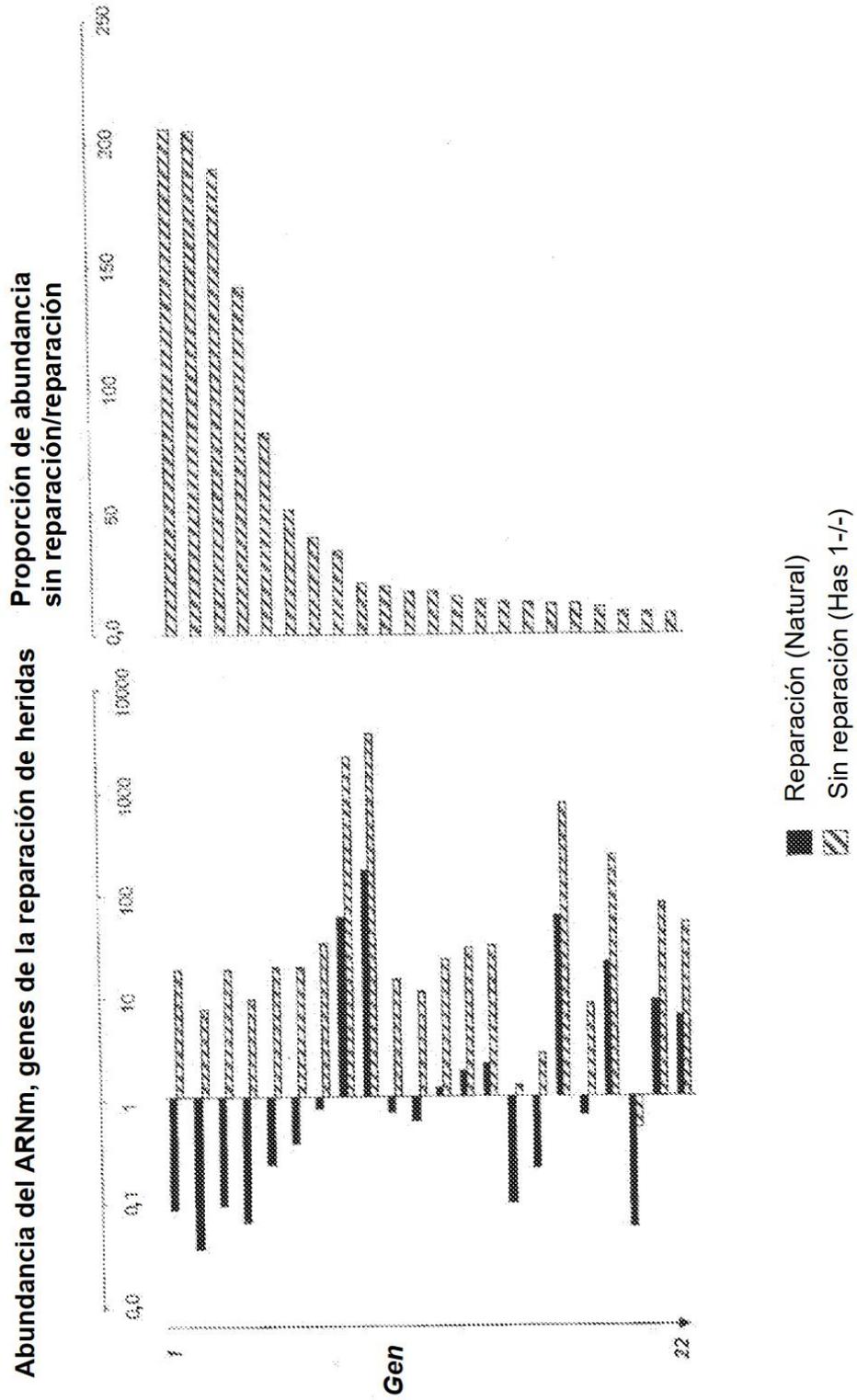


FIGURA 3

