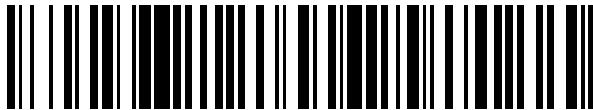


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 040 554**

(21) Número de solicitud: 202430349

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

(12)

SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación:

03.05.2024

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

03.11.2025

(71) Solicitantes:

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (72.00%)
Avenida de la Constitución 18
41071 Sevilla (Sevilla) ES y
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (28.00%)

(72) Inventor/es:

MENA VÁZQUEZ, Natalia;
FERNÁNDEZ NEBRO, Antonio;
MARTIN NÚÑEZ, Gracia María;
RUIZ LIMÓN, Patricia;
MORENO INDIAS, Isabel;
MANRIQUE ARIJA, Sara;
UREÑA GARNICA, Inmaculada;
MUCIENTES RUIZ, Arkaitz y
LISBONA MONTAÑEZ, José Manuel

(74) Agente/Representante:

SAN MARTÍN ALARCIA, Esther

(54) Título: **Método de diagnóstico de pacientes con artritis reumatoide**

(57) Resumen:

Método de diagnóstico de pacientes con artritis reumatoide mediante el uso de nuevos biomarcadores epigenéticos vinculados a la artritis reumatoide. Estos biomarcadores están basados en los niveles de metilación del ADN en regiones específicas del genoma. Concretamente, se han identificado sitios CpG asociados a la artritis reumatoide y sitios CpG asociados a la severidad de la enfermedad.

DESCRIPCIÓN

Método de diagnóstico de pacientes con artritis reumatoide

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se enmarca en el campo de la Medicina y en concreto, en el ámbito 5 de los métodos de diagnóstico de enfermedades autoinmunes, como es el caso de la artritis reumatoide. La presente invención provee de nuevos biomarcadores en sangre que permiten la detección precoz y el diagnóstico de la artritis reumatoide, así como el pronóstico de la progresión de la enfermedad a formas más severas de la misma.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

- 10 La artritis reumatoide (AR) es un trastorno inflamatorio sistémico crónico que causa daño articular grave, discapacidad, deterioro de la calidad de vida, provoca elevados costes socio-sanitarios y se asocia con una elevada mortalidad). La prevalencia de la AR oscila entre el 0,5-1% de la población, afecta a unas 240.000 personas en España y cada año se diagnostican 20.000 nuevos casos.
- 15 El diagnóstico precoz y el tratamiento adecuado con fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAME) son importantes para prevenir el daño articular y la discapacidad.

Sin embargo, en pacientes con enfermedad temprana, las manifestaciones articulares suelen ser difíciles de distinguir de otras formas de poliartritis inflamatoria. Los signos inequívocos de AR, como erosiones articulares o deformidades y otras manifestaciones 20 extra-articulares, se observan principalmente en pacientes con enfermedad de larga duración y mal controlada y con frecuencia están ausentes en la presentación inicial. Es por ello que, los biomarcadores destinados a la detección, diagnóstico y pronóstico de la enfermedad son fundamentales para guiar la evaluación clínica y el manejo terapéutico de la AR. En concreto, el diagnóstico precoz de la AR es esencial para minimizar el impacto de la 25 enfermedad en los pacientes.

Actualmente se han descrito los siguientes biomarcadores de diagnóstico y pronóstico:

-Factor reumatoide (FR): Altos niveles de FR se relacionan con mayor riesgo de padecer AR, pero no es específica de AR, ya que también se ve aumentado en otras enfermedades y

hasta en el 15% de la población sana tienen títulos bajos y esta proporción aumenta con la edad.

-Anticuerpos contra las proteínas citrulinadas (ACPA): Estos anticuerpos, presentes en el 70-90% de pacientes con AR, son muy específicos y permiten establecer un diagnóstico precoz. Se relacionan con una progresión más severa de la enfermedad. Sin embargo, la evidencia actual sugiere que no todos los individuos positivos a ACPA, incluso con otras características de riesgo, como síntomas, desarrollarán AR, al menos dentro del intervalo de tiempo de los grupos estudiados. Por lo tanto, existe la posibilidad de un tratamiento excesivo si cada ACPA positivo recibe una intervención preventiva. Del mismo modo, cabe la posibilidad de que un paciente con AR podría presentar ACPA negativo.

-Proteína anticarbamilada (Anti-CarP): Se pueden detectar años antes del inicio de los síntomas y se relacionan con cuadros más severos de la enfermedad y están muy correlacionados con los anteriores.

La mayoría de los pacientes con AR sintomática se identifican correctamente según los criterios actuales. Sin embargo, hay que destacar que un resultado positivo de FR en ausencia de ACPA no es específico de AR y que un resultado positivo de ACPA en ausencia de FR es moderadamente específico de AR, por lo que sólo la coexistencia de ACPA y FR es altamente específico para la AR y considerablemente más específica que ACPA por sí sola [1]. Además, esta especificidad se encuentra condicionada por un contexto clínico sugestivo de AR. En términos numéricos de especificidad, los ACPA tienen una especificidad de entre el 87,5% y el 96,41% y FR del 85%. En cuanto a la sensibilidad, ambos biomarcadores tienen una sensibilidad similar (~60-80%). Por tanto, los datos deben de interpretarse con cautela.

Además de marcadores de diagnóstico, se han descrito biomarcadores para monitorizar la inflamación en la AR. Se conocen con el nombre de reactantes de fase aguda y se ven alteradas durante procesos inflamatorios como la AR: Serían los siguientes:

- La velocidad de sedimentación globular (VSG) mide la velocidad de caída (sedimentación) de los eritrocitos de la sangre y permite determinar el grado de inflamación. Sin embargo, algunas otras afecciones, como infecciones o anemia, también pueden causar una VSG elevada. Además, los niveles de VSG tienden a incrementar con el envejecimiento.

- La proteína C reactiva (PCR) es una proteína que se encuentra en la sangre y aumenta cuando hay una respuesta inflamatoria en el organismo, por lo que no es específico de la AR.

Además de las pruebas de laboratorio, las pruebas de imagen ayudan al diagnóstico y manejo de la AR, pero no son por sí mismos definitivos en su diagnóstico.

Por tanto, los biomarcadores antes descritos no son suficientes por si solos para definir la AR y el diagnóstico sigue siendo clínico.

La definición de un caso de AR con propósitos clasificatorios se basa en los Criterios de Clasificación del Colegio Americano de Reumatología/European League Against Rheumatism (ACR/EULAR) de 2010 [2], que son los siguientes:

- Síntomas articulares: Los pacientes deben presentar síntomas articulares, como inflamación en las articulaciones, dolor y rigidez.
 - Duración de los síntomas: Los síntomas deben haber estado presentes durante al menos 6 semanas.
 - Hallazgos de laboratorio: Se evalúan varios marcadores, incluyendo la VSG y la PCR, que son indicadores de inflamación. También se pueden realizar pruebas para detectar ACPA y FR.
 - Hallazgos en imágenes: Pueden incluir radiografías o estudios por imágenes que muestren signos de daño articular.
- Según estos criterios, la población diana del tratamiento con FAMEs estaría compuesta por aquellas personas con al menos una articulación inflamada que no sea explicable por otro motivo que reúnen 6/10 puntos para clasificar un paciente de AR definida. Estos criterios se utilizan para ayudar a estandarizar el diagnóstico y la clasificación de la AR en la práctica clínica y en la investigación (**Tabla 1**).
- 25 **Tabla 1:** Criterios de clasificación ACR/EULAR 2010 de artritis reumatoide.

VARIABLES	PUNTOS
A- Afectación articular	
1 articulación grande	0

2- 10 articulaciones grandes	1
1- 3 articulaciones pequeñas (con o sin afectación de grandes articulaciones)	2
4 -10 articulaciones pequeñas (con o sin afectación de grandes articulaciones)	3
>10 articulaciones (al menos 1 articulación pequeña)	5
5 B- Serología (1 test es necesario para la clasificación)	
FR negativo y ACPA negativo	0
FR positivo bajo o ACPA positivo bajo	2
FR positivo o ACPA positivo	3
C- Reactantes de fase aguda (1 test es necesario para la clasificación)	
10 PCR normal y VGS normal	0
PCR elevada o VGS elevada	1
D. Duración de los síntomas	
< 6 semanas	0
> 6 semanas	1

- 15 A pesar de los muchos avances tanto en la comprensión como en el tratamiento de la AR, sigue siendo en gran medida incurable y sus causas son aún desconocidas. En este sentido, se requieren nuevos biomarcadores vinculados a la AR capaces de identificar pacientes con AR en sus primeras manifestaciones o individuos asintomáticos en riesgo, y que, por tanto, posibiliten un diagnóstico temprano de la enfermedad y una mayor precisión de la 20 evaluación clínica. Además, resulta necesario identificar marcadores pronósticos que indiquen la posible progresión de la AR hacia formas más severas de la enfermedad. Todo ello podría a su vez arrojar luz en la patogénesis de esta enfermedad

La etiología exacta de la AR no se conoce completamente, pero se ha descrito ampliamente que la AR es el resultado de una interacción entre factores ambientales en pacientes 25 predisuestos genéticamente. Las modificaciones epigenéticas podrían ser el vínculo entre factores tanto genéticos como ambientales relacionados con la aparición y evolución de la AR. En este sentido, se ha demostrado que existe un amplio estado de metilación en fibroblastos sinoviales y células mononucleares de sangre periférica en locus promotores de genes, como *CXCL12*, *DR3*, *IL-6*, *IL-10* e *IL-1R2*, que pueden afectar a la respuesta inmune, 30 la inflamación y el reclutamiento de leucocitos. También se ha descrito que la hipometilación sinovial del factor de muerte 3 de la AR provoca resistencia a la apoptosis y cambios significativos en los patrones de metilación de las células B y T de pacientes con AR. Todo

ello señala a la metilación del ADN como una marca epigenética que podría estar implicada en la patogénesis de la AR.

En este sentido, WO2023057467A1 describe métodos de diagnóstico de AR basados en el uso de los niveles de metilación de varios sitios CpG, 4, 5, 10, 20 o 23, de un total de 145 5 sitios CpG.

También WO2014036314A2 propone un método de diagnóstico de AR basado en la determinación del estado de metilación de varios loci diferencialmente metilados en el ADN de un sujeto con AR respecto a la población estándar.

Por su parte, el documento US2013129668A1 describe un método para identificar un perfil 10 de metilación CpG indicativo de artritis reumatoide, osteoartritis, su pronóstico y la predicción de la respuesta al tratamiento.

En un estudio de asociación del epigenoma completo (EWAS) con la AR [3] se identifican alteraciones específicas de la enfermedad en la metilación del ADN en las células B. En concreto, se analiza la metilación de CpG en linfocitos B aislados en una cohorte de 15 descubrimiento de pacientes con AR y controles, y se observa metilación diferencial en 64 sitios CpG, de los cuales 10 sitios CpG son validados por una cohorte independiente de pacientes y controles. Estos sitios CpG se ubican en 8 genes y 2 regiones intergénicas. Aunque los resultados señalan genes que pueden impulsar la actividad patogénica de las células B en la AR, también muestran patrones de metilación compartidos con el Lupus 20 eritromatoso sistémico, lo que los haría inespecíficos.

En un estudio del perfil de metilación del ADN del genoma completo asociado a AR [4] se señala que los cambios de metilación asociados a AR son distintos en las poblaciones de linfocitos T y B, identificándose sitios CpG en ambos derivados de AR, que mostraron cambios significativos en la metilación en comparación con sus contrapartes sanas afines.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En la presente invención se han identificados **nuevos biomarcadores epigenéticos** vinculados a la AR, así como a la gravedad de la AR, basados en alteraciones de la metilación del ADN (5mC, nucleótido de citosina modificado mediante la adición de un grupo metilo a su 5º carbono) en regiones específicas del genoma. Concretamente, se han 30 identificado un perfil diferencial en la posición 5' de la citosina en un total de 5 sitios CpG del genoma, de los cuales, 4 CpG han sido asociados a la AR (**cg21950155, cg08161306, 7-**

Downcg08161306, 19-Down-cg08161306) y 1 sitio CpG ha sido asociado con la severidad de la enfermedad (cg15971518). Estos CpG se localizan en los siguientes genes: *PRHOXNB*, *TBC1D22A*, *PRG2*.

Tabla 2: Sitios CpG de la invención.

	Sitio CpG	Gen	Cromosoma	Posición
5	cg21950155	<i>PRHOXNB</i>	13	27981250 (hg38)
	cg08161306	<i>TBC1D22A</i>	22	47169227 (hg19)
	7-Downcg08161306	<i>TBC1D22A</i>	22	47169234 (hg19)
	19-Down-cg08161306	<i>TBC1D22A</i>	22	47169246 (hg19)
10	cg15971518	<i>PRG2</i>	11	57391701 (hg38)

Mediante el uso de estos biomarcadores epigenéticos es posible realizar un diagnóstico y pronóstico de la artritis reumatoide (AR). En concreto, los biomarcadores cg21950155, cg08161306, 7-Down-cg08161306 y 19-Downcg08161306 se refieren a 4 variantes epigenéticas que marcan el diagnóstico de AR; y cg15971518 corresponde a 1 variante epigenética que permite identificar a pacientes con una AR más grave. Permiten, por tanto, diferenciar individuos con AR o con riesgo de AR de los sujetos sanos e identificar personas con AR que tienen un peor pronóstico de la enfermedad.

Los biomarcadores epigenéticos aquí citados se describen por primera vez como variantes epigenéticas que marcan el diagnóstico de AR y la progresión de la enfermedad a formas más graves de AR.

Estos biomarcadores constituyen una alternativa a otros biomarcadores de AR, aportando una mayor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la AR y la posibilidad de personalizar el tratamiento.

Algunos de los biomarcadores de la presente invención, como el cg15971518, supera en sensibilidad (>80%) a los inmunológicos como el FR, mostrando alta especificidad para diagnosticar AR graves.

Por su naturaleza dinámica, estos biomarcadores podrían usarse además para la monitorización del efecto y la idoneidad de las terapias en pacientes AR.

Los sitios CpG cg21950155, cg08161306, 7-Down-cg08161306, 19-Down-cg08161306 y cg15971518 conforman los “sitios CpG de la invención”.

Un **primer aspecto** de la invención describe el uso *in vitro* del nivel de metilación del sitio cg15971518 como biomarcador de diagnóstico y/o pronóstico de la artritis reumatoide 5 severa.

En esta memoria el término “severo” o “severidad” se utiliza como sinónimo de “grave” o “gravedad” y se utilizan indistintamente. Las condiciones para catalogar la artritis reumatoide como severa o grave se encuentran bien establecidas en este campo técnico y son conocidas para un experto medio en la materia. En la presente memoria se dan cuenta de 10 diversos métodos, metodologías, parámetros y sintomatología que sirve actualmente para establecer el grado de severidad de esta enfermedad.

Un **segundo aspecto** de la invención describe el uso *in vitro* del nivel de metilación de los sitios CpG cg21950155, cg08161306, 7-Down-cg08161306 y/o 19-Down-cg08161306 como biomarcador de diagnóstico y/o pronóstico de la artritis reumatoide. Preferentemente, el nivel 15 de metilación de los sitios cg21950155, cg08161306, 7-Down-cg08161306 y 19-Down-cg08161306 se utilizan de forma simultánea. En una realización preferida de este aspecto de la invención, además se incluye el uso de los valores de Factor reumatoide y/ o Anticuerpos contra las proteínas citrulinadas.

En la presente invención se entiende por "diagnóstico" el proceso en el que se identifica una 20 enfermedad, afección o lesión por sus signos y síntomas.

En la presente invención se entiende por "pronóstico" o “prognosis” la valoración de la probabilidad según la cual un sujeto puede padecer una enfermedad y evolucionar a formas más graves de la misma, empeorar, mostrar sintomatología más grave, más aguda o valores alterados en mayor grado respecto a los valores medios de la población sana, o si, por lo 25 contrario, la enfermedad remitirá. El pronóstico de la enfermedad incluye la valoración previa a que se presente sintomatología en individuos pertenecientes a grupos de riesgo o en la población general. También incluye la identificación del estado de desarrollo o evolución de la enfermedad, o de su regresión al inicio de la enfermedad o tras el diagnóstico. Por tanto incluye tanto las probabilidades de que la enfermedad aparezca como de que se presente 30 en formas graves o severas en el futuro.

Tanto el diagnóstico como el pronóstico de la enfermedad puede no ser correcto para el 100% de los sujetos que se van a someter a las pruebas de diagnóstico y/ o pronóstico. Sin embargo, se requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos se pueda identificar como que padecen la enfermedad o que tienen predisposición a la misma, o que

5 tienen posibilidades de progresar a formas más agresivas, agudas o graves de la misma. Si una parte es estadísticamente significativa se puede determinar sin más por el experto en la materia usando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación de valores de significación P, test de Student o funciones discriminantes de Fisher, medidas no paramétricas de Mann

10 Whitney, correlación de Spearman, regresión logística, regresión lineal, área bajo la curva de ROC (AUC). Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001.

Un **tercer aspecto** de la invención describe un método *in vitro* de obtención de datos útiles

15 para el pronóstico y/o diagnóstico de la artritis reumatoide que comprende:

- a) medir el nivel de metilación de los sitios cg21950155, cg08161306, 7-Down-cg08161306 y/o 19-Down-cg08161306 en una muestra aislada de un individuo, y
 - b) comparar el resultado del paso a) con el obtenido en a partir de una muestra de referencia aislada de individuos sanos.
- 20 Un **cuarto aspecto** de la invención describe un método *in vitro* para el pronóstico y/o diagnóstico de la artritis reumatoide que comprende el método *in vitro* de obtención de datos útiles anteriormente descrito y que además comprende:

- c) determinar que el individuo pertenece al grupo de pacientes que presenta o va presentar artritis reumatoide cuando el nivel de metilación de los sitios cg21950155, cg08161306, 7-Down-cg08161306 y/o 19-Down-cg08161306 es significativamente superior al detectado en la muestra de referencia.

En una realización preferida de cualquiera de estos dos métodos de la invención basados en el nivel de metilación de los sitios cg21950155, cg08161306, 7-Down-cg08161306 y 19-Down-cg08161306, éstos se miden de forma simultánea.

- 30 Un **quinto aspecto** de la invención describe un método *in vitro* de obtención de datos útiles para el pronóstico y/o diagnóstico de la artritis reumatoide severa que comprende:

- a) medir el nivel de metilación del sitio cg15971518en una muestra aislada de un individuo, y
- b) comparar el resultado del paso a) con el obtenido a partir de una muestra de referencia aislada de pacientes con artritis reumatoide en un grado no severo.

Un **sexto aspecto** de la invención describe un método *in vitro* para el pronóstico y/o 5 diagnóstico de la artritis reumatoide severa que comprende el método *in vitro* de obtención de datos útiles anteriormente descrito y que además comprende:

- c) determinar que el individuo pertenece al grupo de pacientes que presenta o va presentar artritis reumatoide en grado severo cuando el nivel de metilación del sitio cg15971518, es significativamente superior al detectado en la muestra de referencia.
- 10 Un **séptimo aspecto** de la invención describe un método para valorar eficacia de un tratamiento contra la artritis reumatoide que comprende:
- a) medir el nivel de metilación de los sitios cg21950155, cg08161306, 7-Down-cg08161306, 19-Down-cg08161306 y/o cg15971518en una muestra aislada de un individuo antes del inicio del tratamiento,
 - 15 b) medir el nivel de metilación de los sitios cg21950155, cg08161306, 7-Down-cg08161306, 19-Down-cg08161306 y/o cg15971518en una muestra aislada del mismo individuo tras administrar el tratamiento, y
 - c) determinar que un tratamiento resulta efectivo cuando el nivel de metilación de los sitios cg21950155, cg08161306, 7-Down-cg08161306, 19-Down-cg08161306 y/o cg15971518, en 20 el paso b) son menores que los detectados en el paso a).

En una realización preferida de cualquiera de los métodos de la invención, el nivel de metilación de los sitios CpG se mide en una muestra de sangre aislada, preferiblemente en las células mononucleares de la muestra de sangre periférica aislada y más preferiblemente en células T, células B y/ o monocitos.

- 25 Los métodos de la invención implican la comparación del nivel de metilación de sitios CpG en muestras aisladas de sujetos, con el nivel de metilación de dichos sitios CpG en una muestra de referencia o con un valor mediano.

En el contexto de la presente invención, se entiende por "muestra de referencia" la muestra que se usa para determinar la variación del nivel de metilación de los sitios CpG de la presente invención.

La muestra de referencia se tomará a partir de muestras aisladas de células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Preferiblemente, la muestra biológica aislada es sangre venosa periférica, más preferiblemente las células mononucleares de la muestra de sangre periférica aislada y aun más preferiblemente células T, células B y/o monocitos.

"Valor de referencia" es el nivel de metilación de los sitios CpG de la invención en una muestra de referencia. El perfil de expresión en la muestra de referencia de preferencia puede ser generado a partir de una población de dos o más personas. La población, por ejemplo, pueden contener 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más personas. Los valores de referencia se pueden ajustar a las poblaciones específicas, por ejemplo, un nivel de referencia puede estar relacionado con la edad, por lo que las comparaciones se pueden hacer entre el nivel de metilación de los sitios CpG de la invención en las muestras de los sujetos de una cierta edad y niveles de referencia para una enfermedad particular, el fenotipo, o falta de ella, en un determinado grupo de edad.

La determinación de los niveles de metilación de los sitios CpG de la invención puede llevarse a cabo por cualquier método conocido en el estado de la técnica. Preferentemente, se determinan por métodos cuantitativos, y más preferentemente por pirosecuenciación.

El término "comparación", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación del nivel de metilación de los sitios CpG de la invención de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con el nivel de metilación de los sitios CpG de la invención de una o varias muestras de referencia. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema.

Una vez que el nivel de metilación de los sitios CpG de la invención en relación con los valores de referencia se han determinado, es necesario identificar si existen alteraciones en el nivel de metilación (aumento o disminución del nivel de metilación). El nivel de metilación se considera aumentado en una muestra de la materia objeto de estudio cuando el incremento con respecto a la muestra de referencia es al menos de un 5%, por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos el 20%, por lo menos un 25%, por lo menos 30%, por

lo menos el 35%, por lo menos el 40%, por lo menos 45%, por lo menos el 50%, por lo menos el 55%, por lo menos el 60%, por lo menos 65%, por lo menos el 70%, por lo menos el 75%, por lo menos el 80%, por lo menos el 85%, por lo menos el 90%, por lo menos el 95%, por lo menos 100%, por lo menos 110%, por lo menos 120%, por lo menos

- 5 130%, por lo menos 140%, por lo menos 150%, o más. Del mismo modo, el nivel de metilación se considerada disminuida cuando disminuye con respecto a la muestra de referencia en por lo menos un 5%, por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos el 20%, por lo menos el 25%, por lo menos un 30%, por lo menos el 35%, por lo menos el 40%, por lo menos 45%, por lo menos el 50%, por lo menos el 55%, por lo menos el 60%,
10 por lo menos el 65%, por lo menos 70%, por lo menos el 75%, por lo menos el 80%, por lo menos el 85%, por lo menos el 90%, por lo menos el 95%, por lo menos 100% (es decir, ausente).

Un **octavo aspecto** de la invención describe un kit o dispositivo que comprende reactivos para la identificación en sangre del nivel de metilación de los sitios cg21950155,
15 cg08161306, 7-Down-cg08161306, 19-Down-cg08161306 y cg15971518.

El kit o dispositivo de la invención puede comprender controles, instrucciones de programa e información necesaria para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención.

Un **noveno aspecto** de la invención describe el uso del kit de la invención para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención descritos.

- 20 Otro **aspecto** de la invención se refiere a un programa de ordenador que comprende instrucciones para realizar el procedimiento de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención.

En particular, la invención abarca programas de ordenador dispuestos sobre o dentro de una portadora. La portadora puede ser cualquier entidad o dispositivo capaz de soportar el
25 programa. Como variante, la portadora podría ser un circuito integrado en el que va incluido el programa y que se haya adaptado para ejecutar, o para ser utilizado en la ejecución de los procesos correspondientes.

Por ejemplo, los programas podrían estar incorporados en un medio de almacenamiento, como una memoria ROM, una memoria CD ROM o una memoria ROM de semiconductor,
30 una memoria USB, o un soporte de grabación magnética, por ejemplo, un disco flexible o un disco duro. Alternativamente, los programas podrían estar soportados en una señal

portadora transmisible; por ejemplo, podría tratarse de una señal eléctrica u óptica que podría transportarse a través de cable eléctrico u óptico, por radio o por cualesquiera otros medios.

La invención se extiende también a programas de ordenador adaptados para que cualquier 5 medio de procesamiento pueda llevar a la práctica los métodos de la invención. Los programas de ordenador también abarcan aplicaciones en la nube basadas en dicho procedimiento.

Otros aspectos de la invención se refieren al medio de almacenamiento legible y a la señal 10 transmisible que comprende instrucciones de programa necesarias para la ejecución del método de invención por un ordenador.

El término "individuo", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. Los términos "individuo" "sujeto humano" y "sujeto" se usan indistintamente en esta memoria y son sinónimos de "paciente", y no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier 15 edad, sexo y condición física.

Los métodos de la invención se pueden aplicar con muestras de pacientes de cualquier sexo, es decir, hombres o mujeres, y a cualquier edad.

Los términos "uno o más" o "al menos un" o "varios", tal y como se usan en este documento, incluyen uno y la especificación individualizada de cualquier número que sea más de uno, 20 como dos, tres, cuatro, cinco, seis, etc."

El término "comprende" también podrá interpretarse, en una realización particular, como "consiste en". El término "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos.

Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se 25 desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Se seleccionaron 110 pacientes con AR y 110 controles sanos, de una cohorte de casos incidentes reclutados entre 2007 y 2011 y seguidos prospectivamente en el Departamento de Reumatología del Hospital Universitario Regional de Málaga, España. Los detalles de

esta cohorte han sido previamente publicados [5]. El estudio fue aprobado por el comité de ética médica local y todos los pacientes proporcionaron su consentimiento informado por escrito antes de inscribirse.

- Para la **cohorte descubrimiento** se seleccionaron para análisis de arrays y replicación por pirosecuenciación de la cohorte de incepción de pacientes con AR a 32 sujetos, 16 en cada grupo con fenotipo extremo de factores de gravedad, y 32 controles sanos, pareados por sexo, edad y tiempo de evolución de la enfermedad. Se denominó fenotipo extremo con factores de gravedad a aquellos 16 pacientes que presentaban un promedio de actividad inflamatoria de moderada-alta actividad por DAS28-VSG desde el inicio, positividad para factor reumatoide (FR) y anticuerpos antipéptidos C citrulinados (ACPA), así como títulos elevados de *Collinsella aerofaciens* (OTU ≥ 0.10); y pacientes de fenotipo extremo sin factores de gravedad a aquellos 16 pacientes que presentaban un promedio de actividad inflamatoria de remisión-baja actividad de la enfermedad pareado por sexo y edad con los pacientes de fenotipo extremo y no tuvieran ninguno de los demás factores.
- Los criterios de elegibilidad fueron: edad ≥ 18 años, AR según los criterios de 2010 del American College of Rheumatology / European League Against Rheumatism [2], y haber sido diagnosticados y tratados durante los primeros 12 meses desde el inicio de su enfermedad.

Todos los sujetos se citaron en consulta entre 2018-2020 y se recogieron todos los datos en la fecha de protocolo (fecha de inclusión de los sujetos en el estudio) en una base de datos. Se registraron los datos demográficos (edad en años, sexo y raza), clínicos, de laboratorio y relacionados con el tratamiento. También se recopilaron variables convencionales relacionadas con el riesgo cardiovascular: tabaquismo (activo, exfumador, nunca), obesidad (índice de masa corporal > 30), hipertensión arterial $\geq 140/90$ mmHg o medicación antihipertensiva actual, diabetes diagnosticado según los criterios de la Asociación Americana de Diabetes y antecedentes personales de enfermedad cardiovascular.

Entre las características de los pacientes con AR se incluyó la fecha de inicio de la enfermedad, duración de la enfermedad (tiempo desde el diagnóstico hasta la fecha de corte), y los siguientes datos analíticos: factor reumatoide (FR) (valor de referencia [VR] 20U/ml; títulos altos > 60 U/ml), anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados (ACPA) (VR 10U/ml, valores altos > 340 U/ml), proteína C reactiva (mg/dl) y velocidad de sedimentación globular (mm/h).

Se evalúo la carga de actividad inflamatoria promedio en cada paciente mediante la media de actividad inflamatoria de Disease Disease Activity Score-28 for Rheumatoid Arthritis with erythrocyte sedimentation rate (DAS28-ESR) (rango 0-9,4) recogidos en cada una de sus visitas desde el inicio de la cohorte. Se consideró, según DAS28-VSG, alta actividad un valor superior a 5,1; moderada: 3,2-5,1; baja actividad: 2,6-3,2; y remisión: $\leq 2,6$. Para propósitos de análisis, estos grupos se clasificaron para el presente trabajo como la variable dependiente alta actividad (DAS28-VSG $\geq 3,2$) y baja actividad (DAS28-VSG $< 3,2$). También se tuvieron en cuenta variables de gravedad como la presencia de erosiones radiológicas y función física con la media de Health Assessment Questionnaire (HAQ) a lo largo de la enfermedad [6], así como los niveles de *Collinsela aerofaciens* en la microbiota intestinal [5, 7]. Se registraron los tratamientos con fármacos modificadores de la enfermedad sintéticos (FAMEsc) y biológicos (FAMEb).

En la **Tabla 3** se muestran las características basales de pacientes y controles incluidos en la fase de descubrimiento. No se encontraron diferencias significativas en la mayoría de las características epidemiológicas y comorbilidades entre ambos grupos. Sin embargo, en el grupo de pacientes había más fumadores, mayor frecuencia de obesidad y recuentos más elevados de *Collinsela aerofaciens*.

Tabla 3: Características basales entre pacientes con AR y controles sanos.

Variable	Cohorte descubrimiento		
	AR N= 32	Control N=32	p-valor
Características epidemiológicas			
Edad en años, media (DE)	58.1 (9.6)	57.2 (9.4)	0.690
Sexo, mujer; n (%)	24 (75.0)	24 (75.0)	1.000
Raza, caucásico, n (%)	32 (100.0)	32 (100.0)	1.000
IMC (Kg/m ²), media (DE)	29.9 (5.0)	27.7 (5.2)	0.089
Tabaco			0.015
Nunca fumador, n (%)	12 (37.5)	19 (59.4)	
Exfumador, n (%)	13 (40.6)	3 (9.4)	
Fumador activo, n (%)	7 (21.9)	10 (31.3)	
Comorbilidades			
Hipertensión arterial, n (%)	10 (31.3)	8 (25.0)	0.578
Diabetes Mellitus, n (%)	2 (6.3)	0 (0.0)	0.151
Dislipemia, n (%)	11 (34.4)	5 (15.6)	0.083
Obesidad OMS, n (%)	17 (53.1)	9 (28.1)	0.042
Características clínico-analíticas			
Tiempo de evolución AR, meses, mediana (RIC)	84.5 (77.5-100.5)	-	-
Retraso diagnóstico, meses, mediana	8.3 (4.0-12.3)	-	-

(RIC)			
Erosiones, n (%)	23 (71.9)	-	-
FR >10, n (%)	29 (90.6)	0 (0.0)	<0.001
ACPA >20 U/ml, n (%)	23 (71.9)	0 (0.0)	<0.001
ACPA elevado>340 U/ml	16 (50.0)	0 (0.0)	<0.001
DAS28-ESR puntual, media (DE)	3.0 (1.1)	-	-
Remisión-baja actividad, n (%)	20 (62.5)	-	-
Moderada-alta actividad, n (%)	12 (37.5)	-	-
DAS28-ESR promedio, media (DE)	3.6 (0.5)	-	-
Remisión-baja actividad, n (%)	16 (50.0)	-	-
Moderada-alta actividad, n (%)	16 (50.0)	-	-
HAQ promedio, mediana (RIC)	0.8 (0.6)	-	-
FAME sintético, n (%)	30 (93.8)	0 (0.0)	<0.001
FAME biológico, n (%)	11 (34.4)	0 (0.0)	<0.001
Glucocorticoides al protocolo, n (%)	5 (15.6)	0 (0.0)	0.020
<i>Collinsela aerofaciens</i> frecuencia relativa, mediana (RIC)	0.005 (0.0009-0.01)	0.003 (0.0008-0.005)	0.035
<i>Collinsela aerofaciens</i> frecuencia relativa (OTU ≥ 0.010), n (%)	11 (34.4)	3 (9.4)	0.016

En la **Tabla 4** se muestran las diferencias de los pacientes con AR con y sin gravedad de la cohorte de descubrimiento. Como se puede observar, el número de pacientes no graves y graves fue similar. Se incluyeron fenotipos extremos (50% de los pacientes con ACPA elevado>340 U/ml, etc).

5 **Tabla 4:** Características de los pacientes con AR según gravedad.

Variable	Cohorte descubrimiento		
	AR grave N= 16	AR no grave N=16	p-valor
Características epidemiológicas			
Edad en años, mediana (RIC)	60.2 (7.6)	55.7 (10.3)	0.178
Sexo, mujer; n (%)	12 (75.0)	12 (75.0)	1.000
Raza, caucásico, n (%)	16 (100.0)	16 (100.0)	1.000
IMC (Kg/m ²), media (DE)	30.2 (6.2)	30.5 (5.5)	0.884
Tabaco			0.060
Nunca fumador, n (%)	4 (25.0)	9 (56.3)	
Exfumador, n (%)	8 (50.0)	2 (12.5)	
Fumador activo, n (%)	4 (25.0)	5 (31.3)	
Comorbilidades			
Hipertensión arterial, n (%)	4 (25.0)	6 (37.5)	0.694
Diabetes Mellitus, n (%)	2 (12.5)	0 (0.0)	0.144
Dislipemia, n (%)	6 (37.5)	5 (31.3)	0.465
Obesidad OMS, n (%)	9 (56.3)	7 (43.8)	0.669
Características clínico-analíticas			
Tiempo de evolución AR, meses, media (DS)	72.7 (14.7)	79.8 (18.2)	0.358
Retraso diagnóstico, meses, media (DS)	11.4 (8.5)	6.7 (4.2)	0.401

Erosiones, n (%)	13 (81.3)	6 (37.5)	0.012
FR >10, n (%)	16 (100.0)	13 (81.3)	0.069
ACPA >20 U/ml, n (%)	16 (100.0)	7 (43.8)	<0.001
ACPA elevado>340 U/ml	11 (68.8)	5 (31.1)	0.034
DAS28-ESR puntual, media (DE)	3.2 (1.2)	2.8 (1.0)	0.330
DAS-28 promedio, media (DE)	3.6 (0.6)	2.9 (0.7)	0.017
HAQ promedio, mediana (RIC)	1.1 (0.7)	0.9 (0.5)	0.080
FAME sintético, n (%)	15 (93.8)	16 (100.0)	0.310
FAME biológico, n (%)	9 (56.3)	2 (12.5)	0.009
Glucocorticoides al protocolo, n (%)	2 (12.5)	0 (0.0)	0.365
<i>Collinsela</i> frecuencia relativa, mediana (R/C)	0.011 (0.001-0.026)	0.002 (0.0003-0.007)	0.021
<i>Collinsela aerofaciens</i> frecuencia relativa (OTU ≥ 0.10), n (%)	9 (100.0)	8 (50.0)	0.016

Determinación de la metilación del ADN a lo largo del genoma completo

El ADN genómico se extrajo de 200 μ l de capa leucocitaria utilizando el kit DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN). La pureza y la cantidad de ADN se evaluaron utilizando los equipos NanoDrop (Thermo Fisher, CA, EE. UU.) y Qubit (Life Technologies, CA, EE. UU.), respectivamente. Para la conversión de bisulfito, se trajeron 500 ng de ADN utilizando el kit de metilación de ADN EZ (Zymo Research, CA, EE. UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Todas las muestras de ADN convertidas con bisulfito se almacenaron inmediatamente a -20°C hasta su uso.

Los ensayos de metilación del ADN se realizaron utilizando Illumina Methylation EPIC BeadChip (EPIC) (Illumina, CA, EE. UU.). Se sometió ADN convertido con bisulfito de 32 pacientes con artritis reumatoide y 32 muestras de controles sanos a la hibridación en HM850K, de acuerdo con el protocolo de metilación de Illumina Infinium (<https://support.illumina.com>). La plataforma EPIC evalúa el nivel de metilación del ADN de 853.307 loci alrededor del genoma con una resolución de un solo nucleótido. Los chips se escanearon con el escáner Illumina iScan SQ (Illumina, CA, EE. UU.) y las señales de fluorescencia se interpretaron con los paquetes Bioconductor en el entorno R (v.3.4.4). La anotación de las sondas se realizó a partir de los archivos de Illumina utilizando la versión UCSC hg19 del genoma humano de referencia. Luego, el conjunto de datos se analizó utilizando el paquete minfi [8]. Los niveles de metilación se obtuvieron para cada sitio CpG como valores beta que varían de 0 a 1, lo que se relaciona con el porcentaje de metilación, de 0 a 100%. Una muestra se descartó debido a la inconsistencia entre el sexo informado y el sexo previsto según las señales de metilación en los cromosomas sexuales. Se utilizó el método de preprocessamiento normal-exponencial fuera de banda (Noob) para la corrección

de fondo. Para el control de calidad, se eliminaron del conjunto de datos las sondas con un valor p de detección $> 0,1$ en al menos el 10% de las muestras. Las sondas del EPIC tienen dos diseños químicos diferentes, tipo I y II, que deben normalizarse para que sean comparables entre sí. Esta normalización se realizó utilizando el método BMIQ [9] implementado en el paquete de sandía [10]. Se retiraron las sondas ubicadas en los cromosomas X e Y. Además, las sondas asociadas con SNP conocidos y que presentaban hibridación cruzada también se eliminaron del análisis posterior [11].

Validación por pirosecuenciación de los sitios CpG seleccionados: Biomarcadores potenciales

10 La pirosecuenciación es un método cuantitativo que mide los niveles de metilación del ADN (%) para cada sitio CpG en una región específica del genoma. Este método se utilizó para la validación técnica de los loci diferencialmente metilados identificados por la matriz HM850k. Además de los CpG identificados en el array, la pirosecuenciación también incluyó información de los CpG colindantes a estos, los cuales se nombraron en relación a la
 15 posición del CpG identificado en el array (número de nucleótidos respecto a la posición del CpG del arrays-Down-código CpG array). Se evaluaron por pirosecuenciación los CpG seleccionados, en las mismas muestras de ADN usadas por HM850K (cohorte de descubrimiento: 32 pacientes y 32 controles). Brevemente, se extrajo ADN de la capa leucocitaria utilizando el kit DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN) siguiendo las instrucciones
 20 del fabricante. El ADN se cuantificó utilizando NanoDrop (Thermo Fisher, CA, EE. UU.). Se trató con bisulfito un total de 1000 ng de ADN genómico utilizando el kit EpiTect Bisulfite (QIAGEN). La PCR se realizó utilizando 25 ng de ADN convertido con bisulfito en un volumen final de 15 μ L, utilizando cebadores específicos para cada sitio CpG diseñados por el software PyroMark Assay Design (versión 2.0, Qiagen). A continuación, se utilizaron 10 μ L
 25 del producto amplificado para la pirosecuenciación utilizando reactivos CpG avanzados PyroMark Q48 y el pirosecuenciador PyroMark Q48 (Qiagen, Hamburgo, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Análisis bioinformático diferencial de metilación del ADN a nivel del genoma completo para la identificación de CpG asociados a AR y gravedad de AR.

30 Se seleccionaron los CpG con un umbral mínimo de 0,10 para la diferencia entre los valores β medios de los grupos comparados y un valor de $p < 0,05$. Los valores β fueron transformados logarítmicamente en valores de M , ya que los valores de M muestran mayor homocedasticidad, generando datos más homogéneos y menos dispersos en los extremos

en comparación con los valores de β . Posteriormente, el análisis de comparación entre grupos se realizó mediante la prueba de Wilcox [12]. Además del fenotipo, se utilizó la edad y el sexo como variables de confusión en los modelos.

Análisis bioinformático diferencial de metilación del ADN a nivel del genoma completo para

- 5 la identificación de regiones diferencialmente metiladas asociados a AR y gravedad de AR.

Para identificar las regiones diferencialmente metiladas (DMR) entre grupos se utilizó el paquete mCSEA [13]. Se probó la metilación diferencial en promotores, cuerpos genéticos y regiones de islas CpG. Este método permite detectar DMR incluso cuando la metilación diferencial de CpG individuales es muy sutil, pero consistente entre las regiones genómicas.

- 10 Las DMR con $p<0,05$ se consideraron significativas.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las principales variables, expresadas como frecuencias y porcentajes o como medias (desviación estándar [DE]) o mediana (rango intercuartil [RIQ]), según correspondiera. La normalidad se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-

- 15 Smirnov. Las características clínicas y analíticas se compararon entre pacientes y controles mediante la prueba de χ^2 o la prueba t de Pearson, según correspondiera. Finalmente, se realizó un análisis de regresión logística para identificar los factores asociados a los pacientes con AR, y otro para identificar los factores asociados al fenotipo de gravedad de la AR. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando IBM SPSS Statistics para Windows,
- 20 versión 28 (IBM Corp., Armonk, NY, EE. UU.).

Para evaluar la precisión diagnóstica potencial de los marcadores de metilación seleccionados, se construyeron curvas de características operativas del receptor (ROC) por separado para cada dinucleótido CpG. Las curvas ROC se obtuvieron trazando la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) en el eje y en función de la tasa de falsos positivos (especificidad 1) en el eje x [14]. Al calcular el área bajo la curva (AUC), medimos el poder de los sitios CpG individuales para discriminar entre el grupo de muestras analizado. Si bien un AUC de 1,0 refleja una prueba perfectamente precisa, los valores superiores a 0,7 se consideran aceptables.

Identificación de posiciones diferencialmente metiladas (DMP)

- 30 Se realizó un análisis de comparación de medias de los niveles de metilación de CpG a nivel del genoma completo entre pacientes con artritis reumatoide y controles, así como entre

pacientes graves y no graves. Se identificaron en total 52.430 posiciones CpG diferencialmente metiladas (DMP) entre pacientes y controles, y 83.326 sitios DMP entre AR grave y no grave, según un valor de $p < 0,05$. De estos CpG, 47 CpG y 169 CpG presentaron diferencias absolutas de metilación (Δ beta) $\geq 0,10$ entre los grupos comparados, 5 respectivamente.

Los biomarcadores de la presente invención se seleccionaron dentro de ese grupo. Para ello, además de un Δ beta $\geq 0,10$, debían presentar un valor de $p < 0,01$, estar anotados en genes y formar parte de los DMR ($p < 0,05$). Adicionalmente, para cada CpG, se tuvo en cuenta la superposición y el grado de dispersión de los datos entre los grupos comparados.

10 El cg15971518 no se identificó dentro de DMR, pero se añadió al grupo de CpG seleccionado al identificarse otras DMP relevantes (incluidos entre los 25 CpG más relevantes) dentro del mismo gen, además de cumplir los demás criterios contemplados en la selección.

En cuanto a la validación de los CpG seleccionados en el array (cg21950155, cg08161306, 15 cg05510714, cg05073382, cg15971518, cg19052272), sólo se confirmaron por pirosecuenciación los CpG asociados a la AR y a la gravedad de la AR descritos en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Biomarcadores potenciales de AR y gravedad de la AR: Niveles medios de metilación obtenidos por pirosecuenciación de los CpG seleccionados para los grupos 20 estudiados.

		Datos pirosecuenciación
Gen	ID	Paciente vs. Controles
<i>PRHOXNB</i>	cg21950155	$60,45 \pm 16,11$ vs $47,06 \pm 14,123$, p= 0,001
<i>TBC1D22A</i>	cg08161306	$75,08 \pm 13,92$ vs $63,96 \pm 13,54$, p=0,002
	7-Down-cg08161306	$86,35 \pm 5,43$ vs. $79,46 \pm 6,65$, p<0,0001
	19-Down-cg08161306	$81,23 \pm 4,81$ vs. $74,48 \pm 6,04$ p<0,0001
Gen	ID	AR grave vs AR no grave
<i>PRG2</i>	cg15971518	$37,09 \pm 14,17$ vs $18,1762 \pm 8,86$,

		p<0.0001
ALLC	5-Down-cg19052272	55,04±12,21 vs 65,63±6,10, p=0.02 (p=0.005, test paramétrico)
	cg19052272	75,73±13,10 vs 87,70±5,43, p=0.06 (p=0.003 test paramétrico)

Además, todos los CpG validados por pirosecuenciación con resultados diferenciales se asociaron con AR y con gravedad de la enfermedad, en un modelo de regresión logística (**Tabla 6**).

Tabla 6: Biomarcadores potenciales de AR y gravedad de la AR: Asociación de los CpG seleccionados con la AR y gravedad de la AR en un modelo de regresión logística.

		Datos pirosecuenciación
Gen	ID	Paciente vs. Controles
PRHOXNB	cg21950155	R ² =0.163 OR: 1.059, 95%IC (1.02-1.09), p=0.002*
TBC1D22A	cg08161306	R ² =0.143 OR:1,062 , 95%IC (1.01-1.10), p=0.004*
	7-Down-cg08161306	R ² =0.247 OR:1,21 , 95%IC (1.08-1.34), p<0.0001*
	19-Down-cg08161306	R ² =0.280 OR:1,26 , 95%IC (1.113-1.432), p<0.0001*
Gen	ID	AR grave vs AR no grave
PRG2	cg15971518	R ² =0.385 OR:1.13 , 95%IC (1.04-1.22), p=0.002*
ALLC	5-Down-cg19052272	R ² =0.233 OR: 0.89, 95%IC (0.82-0.97), p=0.01*
	cg19052272	R ² =0.263 OR: 0.89, 95%IC (0.81-0.97), p=0.01*

En la tabla se muestran dos modelos de regresión logística. Modelo 1: variable dependiente: Pacientes (1) vs. Controles (0). Modelo 2: variable dependiente: AR grave (1) vs. AR no grave (0). *p<0.05 al incluir además en el modelo edad y sexo.

Estos CpG además, de acuerdo al área bajo la curva ROC, tuvieron potencial diagnóstico para AR y severidad de AR (**Tabla 7**).

Tabla 7: Biomarcadores potenciales de AR y gravedad de la AR: Potencial diagnóstico de acuerdo al área bajo la curva ROC.

		Datos pirosecuenciación
Gen	ID	*AUC (95% CI), valor de p
<i>PRHOXNB</i>	cg21950155	0.750 (0.626-0.874), p=0.001
<i>TBC1D22A</i>	cg08161306	0.725 (0.599-0.851), p=0.002
	7-Down-cg08161306	0.788 (0.677-0.898), p<0.0001
	19-Down-cg08161306	0.820 (0.713-0.926), p<0.0001
Gen	ID	**AUC (95% CI), valor de p
<i>PRG2</i>	cg15971518	0.871 (0737-1), p<0.0001
<i>ALLC</i>	5-Down-cg19052272	0.273 (0.93-0.454), p=0.29
	cg19052272	0.309(0.065-112), p=0.065

*El estado real positivo es AR.

10 ** El estado real positivo es AR grave.

Nota: 5-Down-cg19052272: 0.727(0.546-0.907), p=0.029 si el estado real positivo es AR NO grave.

También se analizó el uso combinado de los 4 CpG: cg21950155, cg08161306, 7-Down-cg08161306, 19-Down-cg08161306 para el diagnóstico de la AR; con un resultado de **AUC (95% CI) 0.877 (0.794-0.960), p<0.001**.

Finalmente se analizó el AUC el uso combinado de los 4 CpG anteriores y los niveles de Factor reumatoide (FR) y Anticuerpos contra las proteínas citrulinadas (ACPA) para el diagnóstico de la AR; con un resultado de **AUC (95% CI) 0.991 (0.972-1.000), p<0.001**.

Además, cg15971518 y cg19052272 se asociaron con DAS28-VSG ($r=-0.276$ $p=0.01$, $r=0.256$ $p=0.029$, respectivamente). Concretamente cg15971518 predijo DAS28-VSG en un modelo de regresión lineal, ajustado por sexo y edad ($R^2=0.050$, $\beta=-0.257$, $p=0.028$). Por otro lado, la metilación del cg21950155 se asoció a variables relacionadas como por ejemplo la función física (HAQ) ($r=0.275$, $p=0.017$).

Referencias

1. Steiner *et al.*, Should ACR/EULAR criteria be revised changing the RF and ACPA scores?, *Autoimmunity Reviews*, Volume 23, Issue 1, 2024, 103421, ISSN 1568-9972, <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2023.103421>.
- 10 2. Aletaha *et al.*, 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010 Sep;62(9):2569-81. doi: 10.1002/art.27584.
3. Julià *et al.*, Epigenome-wide association study of rheumatoid arthritis identifies differentially methylated loci in B cells. *Hum Mol Genet.* 2017 Jul 15;26(14):2803-2811. doi: 10.1093/hmg/ddx177.
- 15 4. Glossop *et al.*, Genome-wide DNA methylation profiling in rheumatoid arthritis identifies disease-associated methylation changes that are distinct to individual T- and B-lymphocyte populations. *Epigenetics.* 2014 Sep;9(9):1228-37. doi: 10.4161/epi.29718.
5. Ruiz-Limón P, Mena-Vázquez N, Moreno-Indias I, Manrique-Arija S, Lisboa-Montañez JM, Cano-García L, Tinahones FJ, Fernández-Nebro A. Collinsella is associated with cumulative inflammatory burden in an established rheumatoid arthritis cohort. *Biomed Pharmacother.* 2022 Sep;153:113518. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113518.
- 20 6. Esteve-Vives J, Batlle-Gualda E, Reig A. Spanish version of the Health Assessment Questionnaire: reliability, validity and transcultural equivalency. Grupo para la Adaptación del HAQ a la Población Española. *J Rheumatol.* 1993 Dec;20(12):2116-22. English, Spanish. PMID: 8014941.
7. Mena-Vázquez N, Ruiz-Limón P, Moreno-Indias I, Manrique-Arija S, Tinahones FJ, Fernández-Nebro A. Expansion of Rare and Harmful Lineages is Associated with Established Rheumatoid Arthritis. *J Clin Med.* 2020 Apr 7;9(4):1044. doi: 10.3390/jcm9041044. PMID: 32272752; PMCID: PMC7230781.

8. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD, et al. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics*. 2014 May;30(10):1363–9.
9. Teschendorff AE, Marabita F, Lechner M, Bartlett T, Tegner J, Gomez-Cabrero D, et al. A beta-mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data. *Bioinformatics*. 2013 Jan;29(2):189–96.
10. Pidsley R, Y Wong CC, Volta M, Lunnon K, Mill J, Schalkwyk LC. A data-driven approach to preprocessing Illumina 450K methylation array data. *BMC Genomics*. 2013 May;14:293.
11. Zhou W, Laird PW, Shen H. Comprehensive characterization, annotation and innovative use of Infinium DNA methylation BeadChip probes. *Nucleic Acids Res*. 2017 Feb;45(4):e22.
12. Rosner B, Glynn RJ, Lee ML. Extension of the rank sum test for clustered data: two-group comparisons with group membership defined at the subunit level. *Biometrics*. 2006 Dec;62(4):1251-9. doi: 10.1111/j.1541-0420.2006.00582.x. PMID: 17156300.
13. Martorell-Marugán J, González-Rumayor V, Carmona-Sáez P. mCSEA: detecting subtle differentially methylated regions. *Bioinformatics*. 2019 Sep;35(18):3257–62.
14. Mandrekar *et al.*, Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *J Thorac Oncol*. 2010 Sep;5(9):1315-6. doi: 10.1097/JTO.0b013e3181ec173d.

REIVINDICACIONES

1. Uso *in vitro* del nivel de metilación del sitio CpG cg15971518 como biomarcador de diagnóstico y/o pronóstico de artritis reumatoide severa.
- 5 2. Uso *in vitro* del nivel de metilación de los sitios CpG cg08161306, 7-Down-cg08161306, 19-Down-cg08161306 y/o cg21950155 como biomarcador de diagnóstico y/o pronóstico de artritis reumatoide.
- 10 3. El uso según la reivindicación anterior caracterizado por que los biomarcadores se utilizan de forma simultánea.
4. El uso según la reivindicación anterior caracterizado por que además incluye el uso de los niveles de Factor reumatoide y/ o Anticuerpos contra las proteínas citrulinadas.
- 15 5. Un método *in vitro* de obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o pronóstico de artritis reumatoide severa que comprende:
 - a) medir el nivel de metilación del sitio cg15971518 en una muestra aislada de un individuo, y
 - 20 b) comparar el resultado del paso a) con el obtenido a partir de una muestra de referencia aislada de pacientes con artritis reumatoide en un grado no severo.
6. Un método *in vitro* para el diagnóstico y/o pronóstico de la artritis reumatoide severa que comprende el método *in vitro* de obtención de datos útiles según la reivindicación anterior y que además comprende:
 - 25 c) determinar que el individuo pertenece al grupo de pacientes que presenta o va presentar artritis reumatoide en grado severo cuando el nivel de metilación del sitio cg15971518 es significativamente superior al detectado en la muestra de referencia.
7. Un método *in vitro* de obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o pronóstico de la artritis reumatoide que comprende:
 - a) medir el nivel de metilación de los sitios cg08161306, 7-Down-cg08161306, 19-Down-cg08161306 y/o cg21950155 en una muestra aislada de un individuo, y

b) comparar el resultado del paso a) con el obtenido a partir de una muestra de referencia aislada de individuos sanos.

8. Un método *in vitro* para el diagnóstico y/o pronóstico de la artritis reumatoide que 5 comprende el método *in vitro* de obtención de datos útiles según la reivindicación anterior y que además comprende:

c) determinar que el individuo pertenece al grupo de pacientes que presenta o va 10 presentar artritis reumatoide cuando el nivel de metilación de los sitios cg08161306, 7-Down-cg08161306, 19-Down-cg08161306 y/o cg21950155 es significativamente superior al detectado en la muestra de referencia.

9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 o 8 caracterizado por 15 que el nivel de metilación de los sitios cg08161306, 7-Down-cg08161306, 19-Down-cg08161306 y cg21950155 se miden de forma simultánea.

10. Un método para valorar eficacia de un tratamiento contra la artritis reumatoide que comprende:

20 a) medir el nivel de metilación de los sitios cg08161306, 7-Down-cg08161306, 19-Down-cg08161306, cg21950155 y/o cg15971518 en una muestra aislada de un individuo antes del inicio del tratamiento,

b) medir el nivel de metilación de los sitios cg08161306, 7-Down-cg08161306, 19-Down-cg08161306, cg21950155 y/o cg15971518 en una muestra aislada del mismo 25 individuo tras administrar el tratamiento, y

c) determinar que un tratamiento resulta efectivo cuando el nivel de metilación de los sitios cg08161306, 7-Down-cg08161306, 19-Down-cg08161306, cg21950155, y/o cg15971518 en el paso b) son menores que los detectados en el paso a).

30 11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10 caracterizado por que el nivel de metilación de los sitios CpG se mide en una muestra de sangre aislada.

12. El método de acuerdo con la reivindicación anterior caracterizado por que el nivel de 35 metilación de los sitios CpG se mide en las células mononucleares de la muestra de sangre periférica aislada.

13. El método de acuerdo con la reivindicación anterior caracterizado por que el nivel de metilación de los sitios CpG se mide en células T, células B y/ o monocitos.
- 5 14. Un kit o dispositivo que comprende reactivos para la identificación en sangre del nivel de los sitios cg08161306, 7-Down-cg08161306, 19-Down-cg08161306, cg21950155 y cg15971518.
15. Uso del kit según la reivindicación anterior para llevar a cabo el método descrito en
10 las reivindicaciones 11 a 13.



②1 N.º solicitud: 202430349

②2 Fecha de presentación de la solicitud: 03.05.2024

③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: C12Q1/6883 (2018.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	YANG, JIN et al. Clopidogrel resistance is associated with DNA methylation of genes from whole blood of humans. <i>Frontiers in Genetics</i> . 15/01/2021, Vol. 11, artículo nº 583215, ISSN 1664-8021, <DOI: 10.3389/fgene.2020.583215>. Materiales y métodos, tabla 1.	14
X	GARG, P. et al. Pervasive cis effects of variation in copy number of large tandem repeats on local DNA methylation and gene expression. <i>The American Journal of Human Genetics</i> . 31/03/2021, Vol. 108, Nº 5, Páginas 809-824, ISSN 0002-9297, <DOI: 10.1016/j.ajhg.2021.03.016>. tabla S5.	14
A	MARTIN-NULEZ, G. M. et al. DNA methylome alterations as potential diagnostic and prognostic biomarkers in patients with rheumatoid arthritis. <i>Annals of the Rheumatic Diseases</i> , 30/05/2023, Vol. 82, Nº Supplement 1, Páginas 426-427, ISSN 1468-2060, <DOI: 10.1136/annrheumdis-2023-eular.3575>. todo el documento.	1-15
A	ZHAO, JIANAN et al. Identification of clinical characteristics biomarkers for rheumatoid arthritis through targeted DNA methylation sequencing. <i>International Immunopharmacology</i> , 20/04/2024, Vol. 131, artículo nº 111860, ISSN 1567-5769 (print), ISSN 1878-1705 (electronic), <DOI: 10.1016/j.intimp.2024.111860>. todo el documento.	1-15
A	WO 2023057467 A1 (AGE LABS AS) 13/04/2023, todo el documento.	1-15
A	US 2013129668 A1 (FIRESTEIN GARY et al.) 23/05/2013, todo el documento.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº: 1, (2-4) (en parte), 5, 6, (7-15) (en parte)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, AbS Patentes, Espacenet, Google Patents, Patentscope , AbS LNP, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL-EBI