

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 499 397**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2009 E 09756527 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014 EP 2367951**

54 Título: **Composiciones y métodos para tratar deficiencia de hormona del crecimiento**

30 Prioridad:

**26.11.2008 EP 08170028**

**26.11.2008 US 200276 P**

**09.06.2009 EP 09162320**

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

**29.09.2014**

73 Titular/es:

**MERCK SERONO S.A. (100.0%)**

**Centre Industriel**

**1267 Coinsins, CH**

72 Inventor/es:

**TUEFFERD, MARIANNE;**

**DAUVILLIER, JÉRÔME;**

**DELAYE, ARNAUD y**

**SCHNIEPER-SAMEC, SONIA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 499 397 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

Composiciones y métodos para tratar deficiencia de hormona del crecimiento

### Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere, en general, a la farmacogenética, más específicamente a marcadores genéticos asociados con la respuesta clínica a hormona del crecimiento en la deficiencia de hormona del crecimiento (GHD, por sus siglas en inglés). La presente descripción se refiere más en particular a genes humanos que pueden ser utilizados para el diagnóstico y tratamiento de la deficiencia de hormona del crecimiento (GHD).

10 La descripción describe además polimorfismos específicos o alelos de varios genes que están relacionados con la respuesta de la GHD al tratamiento temprano con hormona del crecimiento (GH, por sus siglas en inglés), así como herramientas de diagnóstico y kits basados en estas alteraciones de susceptibilidad. Por lo tanto, la descripción puede ser utilizada en el diagnóstico o la detección de la presencia, riesgo o predisposición a la GHD, así como en la prevención y/o tratamiento de la misma, y en la predicción de la respuesta a tratamiento con hormona del crecimiento (GH).

### Antecedentes de la invención

15 La deficiencia de hormona del crecimiento (GHD) incluye un grupo de diferentes patologías en todas las cuales hay un fallo o reducción de la secreción de hormona del crecimiento (GH). Se puede producir GHD aislada o en combinación con otras deficiencias de hormonas pituitarias. Puede ser congénita o adquirida como consecuencia de traumatismo, infiltraciones, tumores o terapia con radiación. A pesar del gran número de etiologías posibles, la mayoría de los niños tienen GHD idiopática. Dependiendo de los criterios para su diagnóstico, se ha estimado en  
20 diversos estudios que la incidencia de talla baja asociada con GHD infantil grave se sitúa entre 1:4.000 y 1:10.000 niños vivos (PC Sizonenko *et al.*, Growth Horm IGF Res 2001; 11(3):137-165).

25 El crecimiento postnatal de niños con GHD difiere según su etiología. La deficiencia genética de GHD provoca una ralentización progresiva del crecimiento tras un crecimiento normal en los primeros meses de vida. La falta de crecimiento es el principal signo de presentación de GHD en los niños, y la falta de tratamiento con GH en el caso de GHD severa conduce a muy corta estatura en la edad adulta (GH Research Society, J. Clin. Endocrinol Metabol 2000; 85 (11): 3990-3993).

30 El síndrome de Turner (o de Ullrich-Turner) (TS, por sus siglas en inglés) es una anomalía cromosómica caracterizada por la ausencia de todo el cromosoma X o por una delección dentro de ese cromosoma. El TS afecta a una de cada 1.500 a 2.500 niñas nacidas vivas. Se observan talla baja y altura final reducida en 95% de las niñas con TS. La diferencia media entre la estatura adulta media de mujeres normales y la de adultas con TS es de 20 cm (Park E. *et al.*, *Pediatr Res* 1983; 17:1-7). La altura final reducida se debe a una disminución en la velocidad de crecimiento después de la edad de 5 o 6 años (con respecto a las niñas no afectadas) y a la ausencia del aumento puberal de crecimiento (Brook CGD *et al.*, *Arch Dis Child* 1974; 49:789-795) debido a la falta del aumento normal de la secreción de GH que se observa durante la pubertad. La baja estatura en el TS no es atribuible a secreciones deficientes de GH o de factor I de crecimiento similar a la insulina (IGF-I, por sus siglas en inglés) (Cuttlet L *et al.*, *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60:1087-1092), pero se ha descrito una amplitud y frecuencia disminuida de pulsos de GH después de la edad de 8 años en estos pacientes (Ross JL *et al.*, *J Pediatr* 1985; 106:202-206).

35 La hormona del crecimiento (GH) humana derivada de ADN recombinante es el único fármaco aprobado específicamente para el tratamiento de la falta de crecimiento en la niñez y baja estatura, por ejemplo GHD, SGA (pequeño para la edad gestacional, por sus siglas en inglés) y TS. Los actuales regímenes de dosificación para la terapia con GH en la infancia se basan en el peso corporal, y se derivan principalmente de la experiencia empírica. La variabilidad en la respuesta individual de crecimiento frente a la dosis basada en el peso en indicaciones pediátricas ha llevado a la búsqueda de métodos para optimizar la dosificación en base a otros parámetros fisiológicos. Los modelos para la predicción de la respuesta a tratamiento con GH se han basado hasta ahora en  
45 medidas bioquímicas, demográficas y antropométricas, y pueden ser responsables de hasta ~70% del crecimiento en el primer año como respuesta a rGH.

50 Sin embargo, los posibles efectos adicionales de la variabilidad genética no han sido explorados a fondo. Existe, pues, la necesidad de definir un conjunto de marcadores genéticos/genómicos asociados con la respuesta a corto plazo a tratamiento con GH, que podrían complementar los parámetros auxológicos y bioquímicos identificados hasta ahora, con el fin de aumentar la precisión con la que se pueda predecir la respuesta al tratamiento con GH.

### Compendio de la invención

55 De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para identificar, mediante el uso del genotipado o determinación del genotipo, el nivel de respuesta tras el tratamiento con hormona del crecimiento en un individuo que padece deficiencia de hormona del crecimiento, en donde dicho método comprende todas las características de las reivindicaciones 1-2.

De acuerdo con otro aspecto de la descripción, se reivindica hormona del crecimiento para uso en el tratamiento de deficiencia de hormona del crecimiento, en donde están comprendidas todas las características de la reivindicación 3.

**Descripción detallada de la invención**

5 La presente descripción proporciona nuevas estrategias para la detección, diagnóstico y seguimiento de GHD en un individuo, así como para el genotipado de pacientes que tienen GHD. La descripción proporciona además nuevas estrategias para el tratamiento de GHD en un individuo, y para predecir la respuesta al tratamiento con hormona del crecimiento (GH), permitiendo así el ajuste de la dosis necesaria de GH de manera individualizada para cada paciente.

10 Las medicaciones actuales para estimular con GH el crecimiento lineal en GHD incluyen SAIZEN®. El ingrediente activo de SAIZEN® es la somatropina, una hormona del crecimiento humana recombinante (r-hGH) producida por células de mamífero genéticamente modificadas (C127 de ratón). La somatropina es una proteína de cadena sencilla, no glicosilada, de 191 aminoácidos con dos puentes disulfuro.

SAIZEN® está registrado en muchas regiones para las siguientes indicaciones pediátricas:

- 15 ○ retraso del crecimiento en niños provocado por secreción disminuida o ausente de hormona del crecimiento endógena
- retraso del crecimiento en niños debido a causas distintas de GHD (síndrome de Turner, trastorno del crecimiento en niños con talla baja nacidos SGA)
- retraso del crecimiento en niños prepúberes, debido a insuficiencia renal crónica.

20 SAIZEN® está registrado también en 42 países, entre ellos 15 países europeos y Suiza, para la indicación de "deficiencia pronunciada de hormona del crecimiento" en el adulto.

25 Se pretende que el término "hormona del crecimiento (GH)", tal como se emplea en la presente memoria, incluya la hormona del crecimiento, en particular de origen humano, obtenida por aislamiento a partir de fluidos biológicos o bien obtenida mediante técnicas de ADN recombinante a partir de células anfitrión procariotas o eucariotas, así como sus sales, derivados funcionales, variantes, análogos y fragmentos activos.

La GH es una hormona con efectos pleiotrópicos que resultan de los complejos mecanismos que regulan su síntesis y secreción, así como de los efectos aguas abajo de la GH que producen la activación o inhibición de una diversidad de diferentes vías de señalización intracelular, responsables de diferentes efectos biológicos de la GH. A nivel celular, la GH se une a un único receptor, pero activa múltiples respuestas dentro de las células diana individuales.

30 Los genes que responden a GH incluyen el IGF-I, que es el principal mediador de la acción de la GH sobre el crecimiento somático, y también otras proteínas implicadas en la regulación de los efectos metabólicos de la GH. Tras la administración de GH exógena, los efectos sobre el crecimiento somático se dan a largo plazo, pero a corto plazo pueden ser evaluados por una diversidad de marcadores en la sangre periférica que reflejan el inicio de su acción biológica.

35 Típicamente, la hormona del crecimiento humana recombinante se puede administrar a niños en una dosis diaria que varía de aproximadamente 0,02 mg/kg de peso corporal/día hasta aproximadamente 0,07 mg/kg de peso corporal/día. Esta dosis se puede administrar a diario, o bien se puede acumular como dosis semanal, o bien se puede dividir la dosis semanal acumulada en 3 o 6 dosis iguales a la semana.

40 La respuesta a tratamiento con GH, tanto a corto plazo como a largo plazo, presenta una considerable variabilidad interindividual. Esto es particularmente evidente en el punto final de la administración pediátrica de GH, es decir, la respuesta de crecimiento, que varía significativamente entre los sujetos con TS, pero que también es marcada entre niños afectados por GHD.

45 Esta variabilidad se puede investigar a dos niveles diferentes. En primer lugar, al nivel de biomarcador, mediante la evaluación de la respuesta de crecimiento individual a la administración de GH por medio de los marcadores biológicos de la acción de la GH comúnmente usados en la gestión clínica de los pacientes de baja estatura, tal como se describe con más detalle a continuación. En segundo lugar, al nivel de genotipo, que se puede investigar mediante la identificación de los factores genéticos responsables de la variación de biomarcadores asociados con la respuesta a la intervención con GH.

50 Los modelos de predicción del crecimiento intentan predecir la respuesta individual a tratamiento con GH en base a, o bien características previas al tratamiento y/o bien a la respuesta después de un breve período de administración de GH en comparación con la respuesta del grupo. Los parámetros previos al tratamiento que se utilizan en los modelos de predicción existentes para niños con GHD idiopática y síndrome de Turner que reciben terapia con GH incluyen criterios auxológicos, índices de secreción de GH endógena, marcadores biológicos de la acción de la GH, tales como factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) y sus proteínas de unión (IGFBP), y marcadores de recambio óseo.

55

La respuesta a tratamiento con GH se evalúa en la presente memoria a través de cambios en los niveles de IGF-I, siendo el IGF-I un biomarcador primario de la acción de la GH. En la configuración actual, los niveles de IGF-I se evalúan entre la línea de base, poco antes del inicio del tratamiento con GH, y tras 1 mes de tratamiento con GH. Los individuos con respuesta baja muestran una respuesta de baja magnitud en el cambio del nivel de IGF-I entre la línea de base y 1 mes. Los individuos con respuesta alta muestran una respuesta de gran magnitud en el cambio del nivel de IGF-I entre la línea de base y después del tratamiento a corto plazo (por ejemplo, 1 mes).

En los últimos años la farmacogenómica - que incluye la farmacogenética, tal como se describe en la presente solicitud de patente - (abreviadas en conjunto PGx, por sus siglas en inglés) ha sido objeto de la atención de los médicos. La farmacogenética se puede considerar como el estudio de las variaciones interindividuales de la secuencia de ADN en relación con la respuesta a fármacos. En este contexto, se analiza el genoma de un individuo, lo cual lleva a la descripción de marcadores genéticos o alteraciones de la susceptibilidad que tienen importancia a este respecto.

De acuerdo con la presente descripción, la variabilidad de la respuesta a la GH ha sido evaluada mediante la detección de determinantes genéticos (genotipado) potencialmente vinculados con los cambios en los niveles de IGF-I en niños con GHD y TS tratados con GH. Este enfoque es relevante no sólo en la evaluación de la respuesta de eficacia al tratamiento con GH, sino también del perfil de seguridad del tratamiento y sus consecuencias a largo plazo. Se ha documentado que los efectos secundarios potenciales del tratamiento con GH incluyen cambios en la insensibilidad a la insulina y por lo tanto el desarrollo de tolerancia alterada a la glucosa, que pueden ser controlados y puestos de manifiesto mediante mediciones clínicas y de laboratorio habituales. Dentro de este contexto, la identificación de los determinantes genéticos permitirá la predicción de la respuesta individual a la administración de GH y, por tanto, la estratificación de los pacientes para la administración del fármaco.

En este estudio se han seleccionado componentes del sistema de IGF, entre ellos proteínas de unión a IGF, como marcadores o biomarcadores primarios de eficacia. El IGF-I es el marcador de eficacia bioquímica de la exposición a GH más utilizado (De Boer H *et al.*, J Clin Endocrinol Metab 1996; 81(4):1371-1377). Los niveles séricos de IGF-I reflejan el estado de GH en afecciones que implican la secreción patológica de de GH, y son por consiguiente bajos en pacientes con deficiencia de GH. La inducción de IGF-I inducida por GH es rápida y alcanza su máximo en un plazo de pocas semanas tras la administración de GH.

En muchos de los efectos de la GH interviene indirectamente el IGF-I, que se produce principalmente en el hígado. Hay seis proteínas de unión a IGF conocidas, de las cuales la IGFBP-3 es la más abundante en la circulación y representa el 80% de toda la unión a IGF. Tanto el nivel de IGF-I como de IGFBP-3 son muy dependientes de los niveles de GH; así, en la GHD ambos valores son bajos. El IGF-I y la IGFBP-3 no son independientes entre sí; por lo general muestran una correlación, que es especialmente estrecha en los niños.

Los niveles de IGF-I varían en mayor medida con los niveles de GH, ya sea endógena o exógena, que con los niveles de IGFBP-3 niveles, que son más estables en el tiempo. Una concentración sérica o grado de desviación típica (SDS, por sus siglas en inglés) previas al tratamiento con IGF-I o IGFBP-3 (SDS) predicen una buena respuesta durante el primer año de tratamiento en niños con GHD, mientras que los niveles normales pueden predecir una respuesta de crecimiento menos favorable (Kristrom B *et al.*, J Clin Endocrinol Metab 1997; 82(9):2889-2898). Se ha demostrado que los cambios tempranos en el IGF-I y en sus proteínas de unión (IGFBP-3) bajo el tratamiento con GH se correlacionan con los niveles de línea de base y el estado auxológico, la secreción endógena de GH, la dosis de GH y la respuesta inicial de velocidad de crecimiento. El IGF-I y la IGFBP3 son denominados en este documento biomarcadores o marcadores biológicos.

Para comprender los factores genéticos que subyacen a enfermedades hereditarias o a la respuesta a tratamiento farmacológico, la genética clásica examina un solo gen o un grupo de unos pocos genes de interés en relación con el rasgo asociado a las enfermedades hereditarias o a la respuesta al tratamiento farmacológico. La genómica, por el contrario, permite realizar esta búsqueda de determinantes genéticos que resulten en características fenotípicas particulares a nivel de todo el genoma. En el presente estudio, se utilizaron las siguientes técnicas genómicas:

Genotipado: a través de la identificación de variaciones en el ADN, se utilizó este método para detectar determinantes genéticos en genes candidatos que están potencialmente vinculados con la GHD o diferentes tasas de respuesta a tratamiento con GH en esta enfermedad. Se realizó la búsqueda de variantes de ADN usando polimorfismos de nucleótido único (SNP, por sus siglas en inglés) como marcadores genéticos. Un SNP es un locus de ADN en el cual la secuencia de ADN de dos individuos portadores de alelos distintos difiere en un único nucleótido.

Los SNP son los polimorfismos genéticos humanos más comunes y su densidad en el genoma es muy elevada. Se han descubierto y caracterizado hasta la fecha casi 1,8 millones de SNP, y están disponibles públicamente en varias bases de datos importantes ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org), octubre de 2004). La identificación de los SNP de interés de acuerdo con esta descripción se puede realizar por un método desarrollado por Affymetrix o una técnica comparable (Matsuzaki H *et al.*, Genome Research 2004; 14:414-425). Una asociación entre un marcador genético (o un conjunto de marcadores genéticos denominados un haplotipo) y una enfermedad o respuesta a tratamiento (el fenotipo) indica que en la vecindad del marcador puede estar situado un gen de susceptibilidad a la enfermedad o a

- la respuesta. Esta asociación se detecta como una diferencia significativa en la frecuencia de un alelo particular en un locus de SNP (o la diferencia en la frecuencia de un haplotipo) entre grupos de pacientes con diferentes fenotipos. Esta asociación se puede detectar ya sea teniendo en cuenta el estado heterocigótico y homocigótico de los alelos de un SNP dado, la denominada asociación genotípica, o sobre la base de la presencia de uno u otro alelo para un determinado SNP, la denominada asociación alélica. Estos análisis de asociación se llevan a cabo con métodos estadísticos no paramétricos, la prueba de Krustal Wallis para la genotípica y la prueba exacta de Mann Whitney para la alélica.
- Una vez que se ha encontrado que un SNP está asociado a una enfermedad o respuesta a tratamiento, se requiere un análisis predictivo categórico para determinar adicionalmente qué alelo está mejor asociado a la respuesta a tratamiento, y por lo tanto podría servir como marcador predictivo. Este análisis categórico se lleva a cabo con la prueba exacta de Fisher para examinar la significancia de la asociación entre dos variables, la respuesta (baja o alta) y el genotipo, en una tabla de contingencia de  $2 \times 2$ . En una validación adicional de estos hallazgos, se integra la población intermedia y se repiten las pruebas, esta vez en una tabla de contingencia de  $2 \times 3$ .
- Por otra parte, se seleccionan marcadores genéticos predictivos basados en un valor "p" de Fisher inferior a 5% y un umbral de especificidad por encima de 80%. La frecuencia de alelos genéticos en la población de estudio debe estar por encima de 10%.
- Se refleja el índice exacto de probabilidad junto con el intervalo de confianza asociado indicado entre paréntesis, así como los valores positivos predictivos.
- También se ha considerado la combinación de dos marcadores genéticos de estratificación individuales, ya sea a través del término "y" o a través del término "o", siguiendo la línea de la lógica booleana, es decir, exigir que estén presentes o bien uno de los marcadores o bien ambos marcadores.
- Se realizan análisis categóricos complementarios para marcadores significativos, teniendo en cuenta la población total, definida por tres grupos: individuos con respuesta baja, individuos con respuesta alta y el grupo intermedio (que no es ni alta ni baja).
- Los términos "rasgo" y "fenotipo" se pueden usar indistintamente y se refieren a cualquier propiedad clínicamente distinguible, detectable o medible de otro modo de un organismo tal como síntomas de una enfermedad o susceptibilidad a la misma, por ejemplo. Típicamente, los términos "rasgo" o "fenotipo" se usan para referirse a los síntomas de la GHD o TS, o la susceptibilidad hacia los mismos; o para referirse a la respuesta de un individuo a un fármaco que actúe contra GHD o TS.
- Tal como se usa en la presente memoria, el término "alelo" se refiere a una de las formas variantes de una alteración bialélica o multialélica, que difiere de otras formas en su secuencia de nucleótidos. Típicamente, el alelo identificado más frecuentemente es denominado alelo principal, mientras que el otro u otros alelos son denominados alelos raros. Los organismos diploides pueden ser homocigóticos o heterocigóticos para una forma alélica.
- El término "polimorfismo", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a la existencia de dos o más secuencias genómicas alternativas o alelos entre o dentro de diferentes genomas o individuos. El término "polimórfico" hace referencia a la situación en la cual se pueden encontrar en una población dos o más variantes de una secuencia genómica específica. Un "sitio polimórfico" es el locus en el que se produce la variación. Un polimorfismo puede comprender una sustitución, delección o inserción de uno o más nucleótidos. Un "polimorfismo de nucleótido único" (SNP) es el cambio de un único par de bases. Típicamente, un polimorfismo de nucleótido único es el reemplazo de un nucleótido por otro nucleótido en el sitio polimórfico.
- Tal como se discutirá más adelante con mayor detalle, la alteración ("alteración de susceptibilidad") en un gen o polipéptido de acuerdo con la descripción puede ser cualquier alteración de nucleótidos o aminoácidos asociada a la respuesta a tratamiento con hormona del crecimiento (GH) en niños con GHD.
- Un marcador alélico se define como un marcador en el cual el alelo principal está presente ya sea de manera homocigótica o heterocigótica.
- Un marcador genotípico está definido por una asociación entre la respuesta y al menos uno de los tres genotipos posibles: homocigótico para el alelo principal, homocigótico para el alelo raro, o heterocigótico.
- Los marcadores son seleccionados en base a análisis genéticos continuos en toda la población de estudio, separada en una población de GHD.
- Una susceptibilidad puede ser cualquier forma de mutación o mutaciones, delección o delecciones, reordenamiento o reordenamientos y/o inserción o inserciones en la región codificante y/o en la no codificante del gen, ya sea aislada o en diversas combinaciones. Más específicamente, las mutaciones incluyen mutaciones puntuales. Las delecciones pueden abarcar cualquier región de uno o más restos en una parte codificante o no codificante del gen. Las delecciones típicas afectan a regiones pequeñas, tales como dominios (intrones) o secuencias o fragmentos repetidos de menos de aproximadamente 50 pares de bases consecutivos, aunque también pueden producirse delecciones de

mayor tamaño. Las inserciones pueden abarcar la adición de uno o varios restos en una parte codificante o no codificante del gen. Las inserciones pueden comprender normalmente una adición de entre 1 y 50 pares de bases al gen. Los reordenamientos incluyen, por ejemplo, inversiones de la secuencia. También puede constituir una alteración una modificación aberrante de la secuencia polinucleotídica, y puede ser silenciosa (es decir, que no crea ninguna modificación en la secuencia de aminoácidos de la proteína), o bien puede dar lugar, por ejemplo, a sustituciones de aminoácidos, mutaciones del marco de lectura, codones de parada, empalme de ARN, por ejemplo la presencia de un patrón de empalme de tipo no salvaje de un transcrito de ARN mensajero, o bien inestabilidad de ARN o de proteína o un nivel de tipo no salvaje del polipéptido. Además, la alteración puede dar lugar a la producción de un polipéptido con función o estabilidad alteradas, o bien causar una disminución o aumento en los niveles de expresión de proteínas.

Las alteraciones de susceptibilidad típicas o marcadores genéticos son polimorfismos de nucleótido único (SNP) tal como se han descrito en lo que antecede.

La presencia de una alteración en un gen puede detectarse mediante cualquier técnica en sí conocida para el experto en la técnica, entre ellas la secuenciación, pirosecuenciación, hibridación selectiva, amplificación selectiva y/o espectrometría de masas, con inclusión de la espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS). En una realización particular, la alteración se detecta por amplificación selectiva de ácidos nucleicos utilizando uno o varios cebadores específicos. La alteración se detecta mediante hibridación selectiva utilizando una o varias sondas específicas.

Otras técnicas incluyen métodos de genotipado basados en electroforesis en gel tales como PCR acoplada con análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), PCR multiplex, ensayo de ligación de oligonucleótido, y minisequenciación; tecnologías de genotipado basadas en colorantes fluorescentes, tales como ensayo de ligación de oligonucleótidos, pirosecuenciación, extensión de una única base con detección por fluorescencia, hibridación en solución homogénea tal como TaqMan, y genotipado de baliza molecular; amplificación de círculo rodante y ensayos Invader, así como tecnologías de micromatriz basada en chip de ADN y de genotipado por espectrometría de masas.

Los métodos de análisis de expresión proteica son conocidos en la técnica e incluyen electroforesis en gel bidimensional, espectrometría de masas y micromatrices de anticuerpos.

La secuenciación se puede llevar a cabo utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo, usando secuenciadores automáticos. La secuenciación se puede realizar sobre el gen completo o, más preferiblemente, sobre dominios específicos del mismo, por lo general aquellos de los que se sabe o se sospecha que sean portadores de mutaciones deletéreas u otras alteraciones.

La amplificación se puede realizar según diversas técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR), reacción en cadena de ligasa (LCR) y amplificación por desplazamiento de hebra (SDA). Estas técnicas se pueden realizar utilizando reactivos y protocolos disponibles comercialmente. Una técnica preferida es la PCR alelo-específica.

Se debe interpretar el término "gen", tal como se emplea en la presente memoria, como incluyente de cualquier tipo de región de ácido nucleico codificante, entre ellas ADN genómico (ADNg), ADN complementario (ADNc), ADN sintético o semisintético, cualquier forma de ARN correspondiente (por ejemplo, ARNm), etc., así como secuencias no codificantes, tales como intrones, secuencias no traducidas en 5' o en 3', o secuencias reguladoras (por ejemplo, de promotor o de potenciador), etc. El término gen incluye en particular ácidos nucleicos recombinantes, es decir, cualquier molécula de ácido nucleico de origen no natural, creada artificialmente, por ejemplo, por ensamblaje, corte, ligadura o amplificación de secuencias. Un gen tiene típicamente doble cadena, aunque se pueden contemplar otras formas, tales como la cadena sencilla. Los genes se pueden obtener de diversas fuentes y mediante diversas técnicas conocidas en la técnica, tales como mediante el cribado de bibliotecas de ADN o mediante amplificación a partir de diversas fuentes naturales. Los ácidos nucleicos recombinantes se pueden preparar por técnicas convencionales, entre ellas la síntesis química, ingeniería genética, técnicas enzimáticas, o una combinación de las mismas. El término "gen" puede comprender cualquiera y todas las variantes de corte y empalme de dicho gen.

El término "polipéptido" designa, en el contexto de esta descripción, un polímero de aminoácidos con independencia de la longitud del polímero; por lo tanto, péptidos, oligopéptidos y proteínas están incluidos dentro de la definición de polipéptido. Un fragmento de un polipéptido designa cualquier porción de al menos 8 aminoácidos consecutivos de una secuencia de dicha proteína, preferiblemente de al menos aproximadamente 15, más preferiblemente de al menos aproximadamente 20, más preferiblemente de al menos 50, 100, 250, 300 o 350 aminoácidos. Este término también incluye modificaciones post-traduccionales o post-expresión de polipéptidos; por ejemplo, están abarcados expresamente por el término "polipéptido" los polipéptidos que incluyen la unión covalente de grupos glicosilo, grupos acetilo, grupos fosfato, grupos lipídicos y similares. También están incluidos dentro de la definición variantes polipeptídicas que contienen uno o más análogos de un aminoácido (entre ellas, por ejemplo, aminoácidos de origen no natural, aminoácidos que solo se producen naturalmente en un sistema biológico no relacionado, aminoácidos modificados de sistemas mamíferos, etc.), polipéptidos con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como de origen no natural.

El término "tratar" o "tratamiento", tal como se emplea en la presente memoria, significa mejorar, aliviar los síntomas, eliminar la causa de los síntomas, ya sea en una base temporal o permanente, o bien prevenir o retardar la aparición de síntomas del trastorno o condición citados. El término "tratamiento", tal como se usa en la presente memoria, abarca también la expresión "prevención de la enfermedad", que se manifiesta, por ejemplo, en el retraso del inicio de los síntomas de la enfermedad en un grado médicamente significativo. El tratamiento del trastorno se manifiesta, por ejemplo, por una disminución en los síntomas asociados con el trastorno o bien por una mejora en la reaparición de los síntomas del trastorno.

En el sentido de la presente descripción, "respuesta" a tratamiento con hormona del crecimiento en un individuo que padece GHD se entiende como la actividad morbosa residual tras el tratamiento con hormona del crecimiento. Más específicamente, la actividad morbosa residual se asocia en el presente documento a cambios en biomarcadores como una función de la administración de GH a estos individuos que padecen GHD.

Las expresiones "individuos con respuesta alta" o "individuos con buena respuesta" se refieren a aquellos individuos que pueden ser identificados como quienes muestran una respuesta mejor al tratamiento con hormona del crecimiento en comparación con la población con GHD que presenta un nivel medio de respuesta tras el tratamiento con hormona del crecimiento. La "respuesta alta" o "buena respuesta" se manifiesta en una actividad morbosa residual reducida. Más específicamente, la actividad morbosa residual en los "individuos con respuesta alta" o "individuos con buena respuesta" se asocia en la presente memoria a cambios en biomarcadores como una función de la administración de GH a estos individuos que padecen GHD.

Las expresiones "individuos con respuesta baja" o "individuos con mala respuesta" se refieren a aquellos individuos que pueden ser identificados como quienes muestran una respuesta peor al tratamiento con hormona del crecimiento en comparación con la población con GHD que presenta un nivel medio de respuesta tras el tratamiento con hormona del crecimiento. La "respuesta baja" o "mala respuesta" se manifiesta en una actividad morbosa residual incrementada. Más específicamente, la actividad morbosa residual en los "individuos con respuesta baja" o "individuos con mala respuesta" se asocia en la presente memoria a cambios en biomarcadores como una función de la administración de GH a estos individuos que padecen GHD o TS.

La presente descripción se deriva del análisis farmacogenómico de evaluación de la expresión génica y las variaciones génicas en un grupo de 310 pacientes con GHD.

En los ejemplos específicos que se describen en la presente solicitud de patente, las categorías extremas requeridas para los análisis genéticos categóricos se definen por cuartiles:

- los individuos con respuesta baja están representados aquí por el primer y más bajo cuartil (denominado Q1), delimitado así por el 25% más bajo de los datos (percentil 25);
- los individuos con respuesta alta están representados aquí por el tercer y más alto cuartil (denominado Q3), delimitado así por el 75% más alto (percentil 75) ;
- el grupo intermedio está representado aquí como los datos que son >Q1 y <Q3, delimitados así como el 50% intermedio de los datos

en la GHD. En lo que sigue, el índice de probabilidad (OR, por sus siglas en inglés) describe la diferencia entre las categorías extremas (Q1 y Q3), salvo que se especifique otra cosa.

Los resultados de los estudios de acuerdo con la descripción muestran, en particular para la población con GHD:

- un SNP que se puede utilizar para identificar individuos con respuesta baja al tratamiento con GH: rs941798 en el gen PTPN1 como marcador genómico
- dos SNP que se pueden utilizar para identificar individuos con respuesta alta al tratamiento con GH: rs2270777 en el gen CDK4 como marcador genómico, rs970467 en el gen LEPR como marcador alélico

La presente descripción proporciona un método para tratar GHD que comprende detectar la presencia del genotipo AA en el marcador genético SNP rs941798 en el gen PTPN1 que es predictiva de una respuesta baja en base a la respuesta de IGF-I al tratamiento con GH en la población con GHD. El índice de probabilidad (OR) es 5 [1,4-10] en el presente estudio y refleja así la probabilidad de que esté presente AA en individuos con respuesta baja frente a individuos con respuesta alta, respecto de la probabilidad de que estén presentes AG o GG en individuos con respuesta baja frente individuos con respuesta alta en la población con GHD estudiada. Entre los portadores de AA en los individuos con respuesta baja y alta, 73% de los mismos son individuos con respuesta baja; siendo la respuesta la antes definida como cuartiles de la respuesta de IGF-I en la población con GHD estudiada.

Así, la presente descripción está dirigida, en una primera realización, a un método para identificar el nivel de respuesta a tratamiento con hormona del crecimiento en un individuo que padece deficiencia de hormona del crecimiento (GHD), en donde el método comprende los pasos de:

- a. obtener una muestra de ADN de dicho individuo;
- b. determinar si en PTPN1 rs941798 está presente el genotipo AA; y
- c. predecir, a partir del resultado del paso b, la respuesta a tratamiento con hormona del crecimiento.

La presente descripción proporciona un método para tratar GHD que comprende detectar la presencia del genotipo AA en el marcador genético SNP rs2270777 en CDK4 que es predictiva de una respuesta alta en base a la

respuesta de IGF-I al tratamiento con GH en la población con GHD. El índice de probabilidad (OR) es 6.64 [1,7-25,5] en el presente estudio y refleja así la probabilidad de que esté presente AA en individuos con respuesta alta frente a individuos con respuesta baja, respecto de la probabilidad de que estén presentes AG o GG en individuos con respuesta alta frente a individuos con respuesta baja en la población con GHD estudiada. Entre los portadores de AA en los individuos con baja y alta respuesta, 82% de los mismos son individuos con respuesta alta; siendo la respuesta la antes definida como cuartiles de la respuesta de IGF-I en la población con GHD estudiada.

Así, la presente descripción está dirigida, en una segunda realización, a un método para identificar el nivel de respuesta a tratamiento con hormona del crecimiento en un individuo que padece deficiencia de hormona del crecimiento (GHD), en donde el método comprende los pasos de:

- a. obtener una muestra de ADN de dicho individuo;
- b. determinar si en CDK4 rs2270777 está presente el genotipo AA; y
- c. predecir, a partir del resultado del paso b, la respuesta a tratamiento con hormona del crecimiento.

La presente descripción proporciona un método de para tratar GHD que comprende detectar la presencia del alelo A en el marcador genético SNP rs970467 en LEPR que es predictiva de una respuesta alta en base a la respuesta de IGF-I al tratamiento con GH en la población con GHD. El índice de probabilidad (OR) es 4,80 [1,3-22,0] en el presente estudio y refleja así la probabilidad de que esté presente A, en forma de AA o de AG, en individuos con respuesta alta frente a individuos con respuesta baja, respecto de la probabilidad de que esté presente el genotipo GG en individuos con respuesta alta frente a individuos con respuesta baja en la población con GHD estudiada. Entre los portadores del alelo A en los individuos con respuesta baja y alta, 77% de los mismos son individuos con respuesta alta; siendo la respuesta la antes definida como cuartiles de la respuesta de IGF-I en la población con GHD estudiada.

Así, la presente descripción está dirigida, en una tercera realización, a un método para identificar el nivel de respuesta a tratamiento con hormona del crecimiento en un individuo que padece deficiencia de hormona del crecimiento (GHD), en donde el método comprende los pasos de:

- a. obtener una muestra de ADN de dicho individuo;
- b. determinar si en LEPR rs970467 está presente el alelo A; y
- c. predecir, a partir del resultado del paso b, la respuesta a tratamiento con hormona del crecimiento.

La presente descripción proporciona también una combinación de los predictores independientes descritos en lo que antecede para la población con GHD del estudio, que incluye PTPN1 (genotipo AA en rs941798) y no CDK4 (genotipo GG o GA en rs2270777 cuando el marcador CDK4, sobre una base individual, era el genotipo AA): índice de probabilidad (OR) 10 [2,6-33,3] para individuos con respuesta baja. Entre los portadores del genotipo AA en PTPN1 y los portadores del genotipo GG o GA en CDK4 en los individuos con respuesta baja y alta, 86% de los mismos son individuos con respuesta baja; siendo la respuesta la antes definida como cuartiles de la respuesta de IGF-I en la población con GHD estudiada.

Así, la presente descripción está dirigida, en una cuarta realización, a un método para identificar el nivel de respuesta a tratamiento con hormona del crecimiento en un individuo que padece deficiencia de hormona del crecimiento (GHD), en donde el método comprende los pasos de:

- a. obtener una muestra de ADN de dicho individuo;
- b. determinar si en PTPN1 rs941798 está presente el genotipo AA y en CDK4 rs2270777 está presente el genotipo GG o GA; y
- c. predecir, a partir del resultado del paso b, la respuesta a tratamiento con hormona del crecimiento.

La presente descripción proporciona también una combinación de los predictores independientes descritos en lo que antecede para la población con GHD del estudio, que incluye CDK4 (genotipo AA en rs2270777) o bien LEPR (alelo A en rs970467): índice de probabilidad (OR) 7,90 [2,8-22,2] para individuos con respuesta alta. Entre los portadores del genotipo AA en CDK4 o portadores del alelo A en LEPR en los individuos con respuesta baja y alta, 78% de los mismos son individuos con respuesta alta; siendo la respuesta la antes definida como cuartiles de la respuesta de IGF-I en la población con GHD estudiada.

Así, la presente descripción está dirigida, en una quinta realización, a un método para identificar el nivel de respuesta a tratamiento con hormona del crecimiento en un individuo que padece deficiencia de hormona del crecimiento (GHD), en donde el método comprende los pasos de:

- a. obtener una muestra de ADN de dicho individuo;
- b. determinar si en CDK4 rs2270777 está presente el genotipo AA o en LEPR rs970467 está presente el alelo A; y
- c. predecir, a partir del resultado del paso b, la respuesta a tratamiento con hormona del crecimiento.

A, T, C y G representan respectivamente adenina, timina, citosina y guanina.

Se pueden obtener muestras de ADN de acuerdo con la presente descripción extrayendo muestras de sangre de un individuo.

En una forma de realización adicional, la presente descripción está dirigida a un kit para detectar un marcador genético o una combinación de marcadores genéticos que están asociados con el nivel de respuesta a tratamiento con hormona del crecimiento, tal como se ha indicado anteriormente en asociación con la respuesta según biomarcador al tratamiento con GH y en este caso particular a la respuesta de IGF-I.

- 5 El kit comprende una sonda o un conjunto de cebadores oligonucleotídicos diseñados para identificar cada uno de los alelos en PTPN1 - rs941798 y/o en CDK4 - rs2270777 y/o en LEPR - rs970467 y/o en ARRB1 - rs2276310 y/o en CDK4 - rs2069502 y/o en BCL2 - rs4456611 y/o en SH2B2 - rs2906713 y/o en PIK3CB - rs10513055.

10 Preferiblemente, las sondas y cebadores que se pueden utilizar de acuerdo con la descripción son fragmentos de secuencias o bien se hibridan con las secuencias de las que se demostrado que están asociadas con cambios de IGF-I en 1 mes en respuesta al tratamiento con GH.

15 Los resultados de acuerdo con esta descripción se pueden aplicar en estrategias de medicina personalizada. La medicina personalizada es, de acuerdo con la presente solicitud de patente, el uso de información y datos del genotipo de un paciente para estratificar la enfermedad, seleccionar una medicación, proporcionar una terapia, o bien iniciar una medida preventiva, que estén particularmente adecuadas para ese paciente en el momento de la administración. Además de la información genética, otros factores, entre ellos imágenes, analítica e información clínica acerca del proceso morboso o del paciente, desempeñan un papel igualmente importante. Se cree que la medicina personalizada hará posible en el futuro proporcionar el medicamento adecuado, a la dosis adecuada, al paciente adecuado, en el momento adecuado.

20 A los pacientes con un genotipo predictivo de una respuesta alta se les puede proporcionar la dosis estándar de GH, es decir, la dosis utilizada actualmente en la práctica clínica, que es para los niños una dosis diaria que varía de aproximadamente 0,02 mg/kg de peso corporal hasta aproximadamente 0,07 mg/kg de peso corporal. Como alternativa, a estos pacientes se les puede proporcionar una dosis optimizada. A los pacientes con marcadores predictivos de una respuesta baja se les proporcionaría una dosis optimizada de GH. Una dosis optimizada de GH para proporcionar a un individuo con respuesta baja puede ser una dosis de GH incrementada en comparación con la dosis estándar, ya que se ha demostrado una relación dosis-respuesta en términos de velocidad de crecimiento en los primeros 2 años de tratamiento; y ello en un rango de dosis compatible con la dosis fija que se utiliza para tratar a pacientes de DHC con los parámetros actuales. Los individuos con respuesta baja también pueden ser pacientes candidatos para terapias con análogos de acción prolongada de GH con una frecuencia de administración disminuida.

30 En una realización adicional, la presente descripción está dirigida, por tanto, a un método para tratar deficiencia de hormona del crecimiento (GHD) en un individuo que lo necesite, en donde el método comprende los pasos de:  
 a. identificar el nivel de respuesta a tratamiento con hormona del crecimiento según cualquiera de los métodos descritos más arriba,  
 b. tratar al individuo con hormona del crecimiento.

35 En una realización preferida, se identifica al individuo como individuo con respuesta baja y se le trata con una dosis de hormona del crecimiento que está optimizada en comparación con la dosis estándar.

En una realización, a un individuo con respuesta baja se le trata con una dosis de hormona del crecimiento que está incrementada en comparación con la dosis estándar.

40 Se han identificado marcadores genéticos asociados con la respuesta baja o alta, siendo la respuesta descrita en la presente memoria el cambio en IGF-I después de 1 mes de tratamiento con GH. En los métodos de acuerdo con la descripción, estos marcadores genéticos pueden ser considerados tanto aislados como en combinación.

45 En una realización adicional, la descripción se refiere al uso de hormona del crecimiento en la preparación de un medicamento para tratar deficiencia de hormona del crecimiento (GHD) pediátrica en un individuo que lo necesita, en donde el individuo ha sido identificado de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en lo que antecede como individuo con respuesta baja o como individuo con respuesta alta al tratamiento con hormona del crecimiento.

En una realización adicional, la presente descripción se refiere también a hormona del crecimiento para uso en el tratamiento de deficiencia de hormona del crecimiento (GHD) pediátrica en un individuo que lo necesita, en donde el individuo ha sido identificado de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en lo que antecede como individuo con respuesta baja o como individuo con respuesta alta al tratamiento con hormona del crecimiento.

50 En el método de identificación, kit o método de tratamiento de acuerdo con la descripción, la hormona del crecimiento es preferiblemente hormona del crecimiento humana, y más preferiblemente hormona del crecimiento humana recombinante. Realizaciones particulares de la descripción se refieren a hormona del crecimiento comercializada bajo el nombre comercial SAIZEN®.

55 Las formulaciones útiles en un método para tratar a un paciente con GHD según la descripción pueden ser una formulación farmacéutica líquida que comprende hormona del crecimiento o una formulación liofilizada reconstituida que comprende hormona del crecimiento. Preferiblemente, la formulación está estabilizada con un poliol, más

preferiblemente un disacárido y aún más preferiblemente sacarosa.

A continuación, se ilustrará la presente descripción por medio de los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes del alcance de la descripción.

**Ejemplos**

5 Ejemplo 1: Genotipado

1.1. Antecedentes

10 La GHD y TS y las diferentes respuestas al tratamiento con GH (en términos de cambios en niveles de biomarcador después de un mes de tratamiento) en las dos enfermedades pueden estar asociadas cada una con una variación genética específica en uno o varios genes. En el presente estudio, la búsqueda de asociaciones entre genes que contienen variaciones, SNP en la presente descripción, los denominados genes de susceptibilidad, y la enfermedad o respuesta a tratamiento, se han centrado en genes candidatos que han sido seleccionados en base a la función fisiológica de las proteínas que codifican y su potencial implicación en la enfermedades, GHD y TS, o bien en la respuesta a tratamiento con GH. La lista de genes candidatos seleccionados se da en la Tabla 1.

15 La respuesta al tratamiento con GH se midió por la variación de los biomarcadores observados en cuanto a respuesta, tras un mes de tratamiento con GH, siendo los biomarcadores IGF-I ó IGFBP3.

Tabla 1

GENES RELACIONADOS CON GHD o TS

FGF-R3	GH-1
GH-R	GHRH
GHRH-R	Glut4
HESX-1	IGF-1
Insulina-VNTR LHX3	LHX4
POU1F1 (Pit-1)	Prop-1
SHOX-1	SHOX-2
STAT-5	

GENES RELACIONADOS CON GH e IGF-1

ALS	APS (SH2B2)
β Arrestina-1 (ARRB1)	GAB-1
GH1	GH-R
GHRH	GHRH-R
ID1 e ID2	IGF-I
IGF-I-R	IGF-II
IGF-II-R	IGF-BP3
IGF-BP1	IGF-BP-2
IGF- BP10	JAK2
MAP cinasa	PGDF-Rβ
PTP1β (PTPN1)	Subunidades de PI3 cinasa
p60dok	SHC1
STAT-5	SOCS-2
STAT-3	GRB10
SHPS-1	SH2B2

## GENES RELACIONADOS CON INSULINA

Adiponectina (Acrp30 o AdipoQ)	ADR $\beta$ 3)
AKT 1 y AKT 2	Glut4
Glut1 también conocido como SLCA1	GRB2
Insulina (VNTR)	Insulina-R
IRS-1	IRS-2
IRS-4	LEP (leptina)
LEP-R (leptina-R) (Ob-R)	pp120/HA4 (CEACAM8)
PI3 cinasa P85	PI3 cinasa p110 $\alpha$ y p110 $\beta$ (sitio polimórfico de unión a GATA) Protein-fosfatasa 1 (PP1)
PTP1 $\beta$	PDK1
PPAR $\gamma$	PPAR $\gamma$ Co-activator 1 (PGC1)
RAs	SHIP2
SHC1	SOS 1 y 2
SREBP-1c	TNF $\alpha$

## GENES RELACIONADOS CON METABOLISMO OSEO

AR	Aromatasa
ER- $\alpha$	GPCRs
Miogenina	MyoD
p21	PKC $\alpha$
RA-R	

## 5 GENES RELACIONADOS CON ONCOGENES E INFLAMATORIOS

bcl-2	c-Erb B1
c-fos	c-jun
jun-b	c-myc
CDK2, CDK4 y CDK6	Ciclina D
TGF- $\alpha$	TGF- $\beta$
p53	Ras
Rb	WT1

## GENES RELACIONADOS CON INFLAMACION

GATA1	IL-4
IL-6	TNF- $\alpha$

10 Los genes candidatos seleccionados han sido previamente implicados en el crecimiento, en el mecanismo de acción de la hormona del crecimiento o en la deficiencia de hormona del crecimiento o el síndrome de Turner. El propósito del estudio fue investigar si el TS, la GHD, en asociación con la respuesta de IGF-I al tratamiento con GH en estas enfermedades se correlacionan con una variante específica de ADN o un patrón de variantes. La existencia de dicha correlación indicaría que el gen o genes que porten la variante o variantes identificadas, o uno o más genes situados en la proximidad de las variantes, pueden ser gen o genes de susceptibilidad.

## 15 1.2. Materiales y métodos

## 1.2.1. Extracción de muestras de ADN y preparación

20 El análisis se realizó sobre ADN extraído de leucocitos polimorfonucleares. Se recibieron un total de 319 muestras de sangre. De estas 319 muestras, 3 muestras no habían sido doblemente codificadas y fueron destruidas por el laboratorio de genómica. Las 316 muestras restantes entraron en el análisis genómico. De estos 316 ADN analizados, 3 eran duplicados, lo que resultó en que se analizaron 313 ADN correspondientes a 313 pacientes del

estudio Predict. Tras la transferencia de los datos clínicos, 3 pacientes con ADN analizado no tenían ningún dato clínico recogido. Por tanto, se genotiparon 310 pacientes, que eran elegibles para los estudios de asociación. Sólo 299 pacientes, 139 con TS y 160 con GHD, tenían los valores de IGF-I de línea de base y a un mes requeridos para la asociación descrita en la presente solicitud de patente.

5 Se extrajo ADN de 316 muestras de sangre entre noviembre de 2006 y noviembre de 2007, utilizando un kit de Qiagen (QIAamp DNA Blood Midi Kit/Lote 127140243/Ref 51185). Después de la extracción, se controlaron la calidad y cantidad de ADN (QC.1 y QC.2) mediante medidas de absorbancia a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm utilizando un espectrofotómetro (Molecular Devices Spectramax Plus) y electroforesis de muestras de ADN sobre geles de agarosa.

10 QC.1: cociente de absorbancias 260 nm/280 nm y concentración de ADN calculada a partir del valor de absorbancia a 280 nm.

QC.2: Electroforesis sobre gel de agarosa.

Todas las 316 muestras de ADN superaron los criterios de aceptación definidos para QC.1: relación de absorbancia entre 1,7 y 2,1 y concentración de ADN superior a 50 ng/μL

15 Todas las 316 muestras de ADN superaron los criterios de aceptación definidos para QC.2: para cada muestra, era visible una banda claramente definida sobre el gel de agarosa tras la electroforesis, a un peso molecular elevado correspondiente a ADN genómico no degradado.

Una alícuota de 3 μg de ADN de cada muestra se distribuyó en cuatro microplacas de 96 pocillos. Cada microplaca contenía también un control negativo y un ADN genómico de referencia (denominado DNA 103).

20 A las cuatro microplacas se les asignó un nombre que iba desde Saizen-PL1 hasta Saizen-PL4. A las 316 muestras se les asignó un número de genotipado que iba desde 50-1657 hasta 50-11972.

#### 1.2.2. Tecnología de micromatrices de ADN

25 Se utilizó para el genotipado la tecnología de micromatrices de ADN. Una micromatriz es una herramienta experimental que fue desarrollada para satisfacer las necesidades de análisis de todo el genoma para cribar simultáneamente un gran número de genes o productos génicos. Debido a su formato miniaturizado y la posibilidad de automatización, una micromatriz es adecuada para análisis de alto rendimiento. La técnica se basa en la capacidad de dos moléculas de ácido nucleico para unirse selectivamente (hibridarse) entre sí en caso de que sus secuencias sean complementarias. Un conjunto de diferentes fragmentos de ácidos nucleicos, la sonda, se une covalentemente a posiciones definidas sobre un soporte sólido de unos pocos centímetros cuadrados. El material genético a analizar, la diana, es expuesto a la sonda matrizada. Utilizando la propiedad de hibridación selectiva de los ácidos nucleicos, las sondas están diseñadas de tal manera que se unirán sólo a aquellas moléculas diana que son de interés en la investigación en particular. El marcado selectivo del complejo unido y el conocimiento de la identidad de cada sonda en función de su ubicación sobre la matriz permite la identificación de la molécula diana.

35 En este experimento, se utilizó el protocolo de la tecnología Illumina GoldenGate. Esta tecnología se basa en perlas de sílice de 3 micrómetros que se autoensamblan en micropozos en cualquiera de los dos sustratos, haces de fibra óptica o portaobjetos de sílice plana. Cuando se ensamblaron al azar en uno de estos dos sustratos, las perlas tenían un espaciado uniforme de ~5,7 micrómetros. Cada perla está cubierta de cientos de miles de copias de un oligonucleótido específico, que actúan como secuencias de captura.

40 Se seleccionaron 1.536 SNP de los genes candidatos antes mencionados y se genotiparon satisfactoriamente 1.517 SNP para todos los individuos y se analizaron en 98 genes candidatos de estos 1.536 SNP.

Las muestras fueron distribuidas aleatoriamente por el técnico del banco biológico en cuatro microplacas de 96 pocillos. A continuación, cada microplaca se trató secuencialmente utilizando un kit Illumina diferente y matriz Sentrix Array Matrix para cada placa.

#### 1.2.3. Análisis genético

45 El análisis de datos se realizó mediante el programa informático SAS (SAS 9.1.3, Service Pack 4).

#### 1.2.4. Estimación de estructura de desequilibrio de ligamiento (LD)

El número de bloques de desequilibrio de ligamiento (LD) en cada gen se estimó en los dos grupos de enfermedad por medio del procedimiento de SAS "ALLELE", a través de la interfaz de JMP Genomics.

## 1.2.5. Pruebas estadísticas

- Análisis continuos

Para un fenotipo dado (por ejemplo, cambio en IGF-I SDS), se combinaron para cada paciente en una tabla única los datos genotípicos (codificados como recuentos de alelo raro y recuentos de alelo principal), y se construyeron las variables de indicador de presencia de alelo principal y raro.

*Asociación genotípica*

La asociación entre el genotipo (considerado como una variable categórica con los valores 0, 1, 2) y la variable cuantitativa fenotípica fue evaluada mediante la prueba de Krustal Wallis implementada mediante el procedimiento de SAS "GLM" (siglas inglesas de "modelo lineal general"). El resultado principal de este procedimiento fue una tabla que proporcionaba esencialmente los niveles de probabilidad (valores p) para el efecto categórico del genotipo sobre el fenotipo, para cada SNP y grupo de enfermedad.

*Asociación alélica*

De manera similar, la asociación entre la presencia del alelo principal y la variable cuantitativa de biomarcador fue evaluada mediante la prueba exacta de Mann Whitney implementada mediante el procedimiento de SAS "GLM". Lo mismo se repitió para el alelo raro.

El resultado de estos procedimientos fue una tabla que esencialmente proporcionaba los valores p para el efecto sobre el fenotipo de la presencia del alelo correspondiente, para cada SNP y grupo de enfermedad.

*Selección de SNP significativamente asociados y genes*

Se elaboró una tabla resumen para combinar los resultados de las pruebas de asociación realizadas (valor p y naturaleza de la variable genética correspondiente), junto con el tipo de enfermedad, SNP y nombres de genes, número de SNP probados y de bloques de LD en el gen, y frecuencia del alelo raro (MAF, por sus siglas en inglés) en el SNP y eficiencia de genotipado ("call rate" en inglés).

Para la selección de asociaciones significativas, se aplicó la corrección de Bonferroni para múltiples pruebas a fin de calcular los valores p ajustados en función del número de bloques de LD examinados en el mismo gen (Tabla 4, valor p bruto).

Se llevó a cabo una selección inicial agresiva de genes que contenían SNP elegibles para la asociación, seleccionando observaciones en las cuales el MAF fuera mayor que 0,1, a fin de tener una frecuencia del alelo raro (MAF) superior a 10% (Tabla 4; MAF), la eficiencia de genotipado fuera superior a 0,95 (Tabla 4; eficiencia de genotipado), y el valor p inicial, sin ajustar, fuera menor que el valor de corte de significancia nominal 0.05.

La selección final de genes significativamente asociados se basó en el ajuste de los valores p brutos del SNP por el número de bloques de LD (Tabla 4; valores p ajustados), utilizado como una estimación del número de pruebas independientes aplicadas a cada gen.

- Análisis categórico: predicción

Para evaluar un posible uso en la estratificación de pacientes, los SNP que habían sido asociados con la respuesta de IGF-I SDS fueron analizados además en cuanto a su asociación con categorías de respuestas predefinidas:

- Individuos con buena respuesta, que tienen una respuesta de IGF-I superior al valor del tercer cuartil de la distribución de cambio de IGF-I SDS (siendo el cambio la variación del nivel de IGF-I SDS tras un mes de tratamiento con GH respecto al nivel de IGF-I SDS evaluado poco antes del tratamiento). En GHD, individuos con buena respuesta eran niños que mostraban un cambio de IGF-I SDS superior a 1,91. En TS, individuos con buena respuesta eran niños que mostraban un cambio de IGF-I SDS superior a 2,63.

- Individuos con mala respuesta, que tienen una respuesta de IGF-I de respuesta inferior al valor del primer cuartil de distribución de cambio de IGF-I SDS (siendo el cambio la variación del nivel de IGF-I SDS tras un mes de tratamiento con GH respecto al nivel de IGF-I SDS evaluado poco antes del tratamiento). En GHD, individuos con mala respuesta eran niños que mostraban un cambio de IGF-I SDS inferior a 0,81. En TS, individuos con mala respuesta eran niños que mostraban un cambio de IGF-I SDS inferior a 1,15.

Los análisis se llevaron a cabo tanto para GHD como para TS.

Se seleccionaron SNP como marcadores potenciales de estratificación sólo si cumplían los siguientes criterios:

- Valor p de prueba exacta de Fisher inferior a 0,05
- Especificidad por encima de 80% en un grupo de respuesta

- Una frecuencia de pacientes que muestran el genotipo por enfermedad  $\geq 10\%$  de la población de individuos

con respuesta alta y baja.

Se realizó un análisis complementario para aquellos marcadores sobre la población general de GH o TS (con inclusión de grupos de individuos de respuesta baja, alta e intermedia), para los cuales se presentan los índices de probabilidad y frecuencia.

### 1.3. Resultados

El propósito de este estudio era la identificación de marcadores genéticos asociados a la variación de biomarcadores observados en respuesta a 4 semanas de tratamiento con SAIZEN® (ingrediente activo: hormona del crecimiento recombinante humana), en niños con GHD y TS.

#### Asociación con la respuesta de IGF-I SDS

Se consideró en este estudio la concentración sérica de IGF-I como el biomarcador sustituto primario de la respuesta de crecimiento. En esta sección, "respuesta de IGF-I" se define como la diferencia entre los niveles de SDS antes y después de 4 semanas de tratamiento con SAIZEN®.

Asociación de SNP en genes candidatos a través de análisis continuo

Se analizaron los SNP en cuanto a asociación (genotípica, dominancia del alelo principal o raro, alélica aditiva) en los dos grupos de enfermedad, proporcionando 9.165 valores p de la prueba (3 pruebas  $\times$  (1.526 SNP en GHD + 1.529 SNP en TS)). Los SNP asociados a través de análisis continuos se presentan en la Tabla 4.

Análisis de predicción de SNP a través de análisis por categorías

Teniendo en cuenta las categorías de respuesta, se encontró una asociación para niños con GHD con un SNP en el gen PTPN1, con un SNP en el gen CDK4 y con un SNP en el gen LEPR.

- Niños con GHD

Tabla 2: Resultados de genotipado para SNP marcador en pacientes de GHD

SNP	Gen	Marcador	Cambio de IGF-I SDS < 1er cuartil		Cambio de IGF-I SDS entre 1er y 3er cuartiles		Cambio de IGF-I SDS > 3er cuartil	
			Portadores de marcador	No portadores de marcador	Portadores de marcador	No portadores de marcador	Portadores de marcador	No portadores de marcador
rs941798	PTPN1	AA	19	21	19	61	7	33
rs2270777	CDK4	AA	3	37	18	62	14	26
rs970467	LEPR	Alelo A	4	36	14	66	14	26
rs2270777 ó rs941798	No CDK4 y PTPN1	rs2270777: alelo G rs941798: AA	18	22	13	67	3	37
rs2270777 ó rs970467	CDK4 ó LEPR	rs2270777: AA rs970467: alelo A	7	33	29	51	25	15

La PTPN1, proteína-tirosín-fosfatasa 1B, es el miembro fundador de la familia de proteína-tirosín-fosfatasa (PTP), cuyos miembros son conocidos por ser moléculas de señalización que regulan diversos procesos celulares, entre ellos el crecimiento celular, la diferenciación y el ciclo mitótico. Más importante en el contexto de la asociación con el mecanismo de acción de la GH, se ha demostrado que la PTP-1B regula la señalización de GH mediante la reducción del grado de fosforilación de JAK2 (Gu *et al.*, Mol Cell Biol., 23(11):3753-62, 2003). La PTP-1B es más conocida por ser un regulador negativo de la señalización de insulina al desfosforilar los restos de fosfotirosina de la cinasa de receptor de insulina (Ramachandran & Kennedy, Curr Top Med Chem; 3(7):749-57, 2003). Es interesante en el contexto de los marcadores genéticos actuales descritos, que se ha descrito que la proteína-tirosín-fosfatasa 1B

(PTP1B) también actúa como un inhibidor de la señalización de leptina *in vitro* (Kasubaska *et al.*, Mol Cell Endo, 195(1-2):109-18, 2003).

rs941798 (A/G) está ubicado en el cromosoma 20. En pacientes con GHD, 28% (45 de 160) de los niños eran homocigóticos para el alelo A (alelo raro).

- 5 El hecho de portar el genotipo AA para rs941798 tiene un valor predictivo positivo de 42% (19 de 45) en niños con GHD para individuos con respuesta baja, basado en el cambio en IGF-I SDS tras un mes (Tabla 2).

Existen 3,25 veces más individuos con respuesta baja que individuos con respuesta no baja entre los niños portadores de AA que entre los portadores del alelo G (OR = 3,24 [1,43;7,69])

- 10 La CDK4, cinasa 4 dependiente de ciclina, es un miembro de la familia de proteína-cinasas Ser/Thr, y es un regulador clave de la progresión de la fase G1 del ciclo celular. En efecto, se ha demostrado que la actividad de CDK4 está restringida a la fase G1-S, durante la cual la CDK4 forma complejos con las ciclinas de tipo D (por ejemplo, D1; D2; D3), conocidas colectivamente por controlar la progresión de las células a lo largo del ciclo celular (Brugess *et al.*, J Biol Chem, 2004, 281(15):9987-95).

- 15 En animales, se ha demostrado que CDK4 es indispensable para la proliferación postnatal de la pituitaria anterior tal como se demuestra en *Cdk4* *-/-*, que da como resultado retraso del crecimiento, diabetes e infertilidad. Estos fenotipos endocrinos específicos han sido relacionados con el eje GH utilizando ratones con expresión transgénica de hormona liberadora de hormona del crecimiento humana (GHRH) y que presentan hiperplasia pituitaria. Cuando se añadió un fondo de *Cdk4* *-/-*, la hiperplasia hipofisaria fue abolida por completo (Jirawatnotai *et al.*, J Biol Chem. 2004, 279(49):51100-6). Se sabe que CDK4 funciona en estrecha colaboración con CDK6, que ha sido vinculada con la talla final (Dixon *et al.*, Nature Genetics, 2007, 39(10):1202-1207).

- 20 rs2270777 (A/G) está ubicado en el cromosoma 12. En pacientes con GHD, 22% (35 de 160) de los niños eran homocigóticos para el alelo A (alelo raro) en el SNP rs2270777 (en el gen CDK4).

El hecho de portar el genotipo AA en el SNP rs2270777 tiene un valor predictivo positivo de 91% (32 de 35) en niños con GHD respecto a respuesta no baja, basándose en el cambio en IGF-I SDS tras un mes (Tabla 2).

- 25 Existen 4,4 veces más individuos con respuesta no baja que individuos con respuesta baja en niños portadores de AA que en portadores del alelo G (OR = 4,4 [1,3-24,1])

- 30 LEPR es el receptor de leptina, una hormona secretada por adipocitos blancos y marrones y que se considera fundamental para la regulación de la composición corporal, en parte a través de la regulación de la ingesta de alimentos y, aunque esto es materia de debate, a través de la regulación del gasto energético. Se ha asociado una caída en los niveles plasmáticos de leptina con el tratamiento con GH en niños (Tauch *et al.*, 1999, Horm Res, 50:18-21). También existe una correlación inversa entre leptina y niveles de GH en mujeres alimentadas y en ayunas (Giustina y Veldhuis, Endocrine Reviews, 1998, 19(6):7171-797), en donde la evidencia favorece la interpretación de una regulación *in vivo* de la hormona del crecimiento por la leptina (Carro *et al.*, Endocrinology, 1997, 139:2203-2206).

- 35 El receptor de leptina tiene diversas isoformas en múltiples órganos, una distribución amplia que sugiere que la leptina es un importante mediador endocrino. Es importante destacar que el análisis de estos tejidos ha demostrado que la mayoría de los transcritos detectados están en la forma del dominio intracelular corto, estando la forma larga fuertemente expresada en varios núcleos hipotalámicos (Margetic S *et al.*, Int J Obes Relat Metab Disorders, 2002;26 (11):1407-33).

- 40 rs970467 (A/G) está ubicado en el cromosoma 1.

En pacientes con GHD, 20% (32 de 160) de los niños eran portadores del alelo A (alelo raro) en el SNP rs970467 (en el gen LEPR).

- 45 El hecho de portar el alelo A en el SNP rs970467 tiene un valor predictivo positivo de 43% (14 de 32) en niños con GHD para respuesta alta basada en el cambio de IGF-I SDS tras un mes. Hay 3 veces más individuos con respuesta alta que individuos con respuesta baja o intermedia entre los niños portadores de AA que entre los portadores del alelo A (OR = 3,02 [1,22-7,5])

Combinando los marcadores no CDK4 (rs2270777) (alelo G, GG o GA), y PTPN1 (rs941798) en pacientes con respuesta a GHD, 21% (34 de 160) de los niños eran portadores del alelo G en el SNP rs2270777 y del genotipo AA en el SNP rs941798.

- 50 El hecho de portar el alelo G en el SNP rs2270777 y el genotipo AA en el SNP rs941798 tiene un valor predictivo positivo de 53% (18 de 34) en niños con GHD para respuesta baja basada en el cambio de IGF-I SDS tras un mes.

Hay 5,25 veces más individuos con respuesta baja que individuos con respuesta no baja entre niños portadores de marcadores "no CDK4 y PTPN1" que entre los no portadores (OR = 5,25 [2,16-12,9]).

Combinando los marcadores CDK4 (rs2270777) o LEPR (rs970467) en pacientes con respuesta a GHD, el 38% (61 de 160) de los niños eran portadores del genotipo AA en el SNP rs2270777 o de alelo A en el SNP rs970467.

El hecho de portar el genotipo AA en el SNP rs2270777 o el alelo A en el SNP rs970467 tiene un valor predictivo positivo de 88% (54 de 61) en niños con GHD para los individuos con respuesta no baja, basándose en el cambio de IGF-I SDS tras un mes.

Hay 3,8 veces más individuos con respuesta no baja que individuos con respuesta baja entre los niños portadores de marcadores "CDK4 o LEPR" que entre los no portadores (OR = 3,8 [1,5-11]).

• Niños con TS

Tabla 3. Resultados de genotipado para SNP de marcador en pacientes con TS

SNP	Gen	Marcador	Cambio de IGF-I SDS < 1er cuartil		Cambio de IGF-I SDS entre 1er y 3er cuartiles		Cambio de IGF-I SDS > 3er cuartil	
			Portadores de marcador	No portadores de marcador	Portadores de marcador	No portadores de marcador	Portadores de marcador	No portadores de marcador
rs2276310	ARRB1	Alelo A	5	30	10	59	15	20
rs4456611	BCL2	GG	13	22	11	58	3	32
rs2069502	CDK4	GG	19	16	35	34	5	30
rs2906713	SH2B2	Alelo C	14	21	19	50	5	30
rs10513055	PIK3CB	Alelo C	14	21	17	52	5	30
rs2270777	CDK4	AA	8	27	18	51	0	35
rs4456611 ó rs2906713	BCL2 ó SH2B2	rs4456611: GG rs2906713: alelo C	22	13	28	41	7	28
rs4456611 ó rs10513055	BCL2 ó PIK3CB	rs4456611: GG rs10513055: alelo C	21	14	25	44	7	28
rs4456611 ó rs2069502	BCL2 ó CDK4	rs4456611: GG rs2069502: GG	28	7	41	28	7	28

ARRB1, la arrestina-beta 1, es un miembro de la familia de proteínas arrestina/beta-arrestina, proteínas citosólicas que se unen a receptores acoplados a proteína G (GPCR, por sus siglas en inglés) específicos que son fosforilados por cinasas de receptor acoplado a proteína G. Esta unión conduce a una desensibilización que inhibe el acoplamiento de receptor y proteína G y por lo tanto atenúa la señalización del receptor (Ferguson SS, Caron MG; 1998; Semin. Cell Dev. Biol, 1998). El resultado final es una amortiguación de las respuestas celulares; de ahí el nombre de "arrestina" para una proteína que detiene ("arrests", en inglés) la transducción de señal.

Esto ha sido ampliamente demostrado con receptores beta-adrenérgicos, en donde la arrestina beta 1 actúa como un cofactor en la desensibilización, mediada por cinasa de receptor beta-adrenérgico (BARK, por sus siglas en inglés), de receptores beta-adrenérgicos (Von Zastrow M, Neuropsychopharmacology - 5th Generation of Progress). También se ha demostrado que la arrestina beta 1 es crucial para la ubiquitinación y la regulación hacia abajo del receptor de factor-1 de crecimiento similar a insulina estimulado por ligando (IGF-1R), al actuar como adaptador para la MDM2, una ubiquitín-ligasa E3 que ubiquitina el IGF-1R (Girmita *et al.*, J Biol Chem, 2005, 280(26), 24412-24419).

rs2276310 (A/G) está ubicado en el cromosoma 11.

En pacientes con TS, 21% (30 de 139) de los niños eran portadores del alelo A (alelo raro) en el SNP rs2276310 (en el gen ARRB1).

El hecho de portar el alelo A para el SNP rs2276310 tiene un valor predictivo positivo de 50% (15 de 30) en niños con TS para respuesta alta, basada en el cambio de IGF-I SDS tras un mes. Hay 4,34 veces más individuos con respuesta alta que individuos con respuesta baja o intermedia entre los niños portadores del alelo A que entre los portadores de GG (OR = 4,34 [1,7-11,49]).

5 BCL2: La proteína Bcl-2 (linfoma 2 de células B) es parte de una familia, la familia Bcl2, de 25 genes que ejercen efectos pro-apoptóticos para unos y otros efectos anti-apoptóticos para otros. Su papel en la apoptosis se refiere a su localización celular: estas proteínas son parte integral de la membrana mitocondrial externa y gobiernan la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (MOMP, por sus siglas e inglés) en un sistema de bucle de realimentación con caspasas.

10 La Bcl-2 ejerce efectos anti-apoptóticos, bloqueando la muerte por apoptosis de algunas células. Se ha demostrado que el IGF1 promueve la resistencia a la apoptosis en células de melanoma a través de expresión incrementada de BCL2 (Hilmi C *et al.*; J Invest Dermatol. 2008;128(6):1499-505). La Bcl-2 también es crucial en la regulación de células inflamatorias, y se ha demostrado que la hormona del crecimiento tiene una función reguladora en células monocíticas (Haeflner A *et al.*; Eur J Immunol. 1999; 29(1):334-44).

15 rs4456611 (A/G) está ubicado en el cromosoma 18.

En pacientes con TS, 19% (27 de 139) de los niños eran portadores del genotipo GG para el SNP rs4456611 (en el gen BCL2).

20 El hecho de portar el genotipo GG en el SNP rs4456611 tiene un valor predictivo positivo de 48% (13 de 27) en los niños con TS para la respuesta baja basada en el cambio de IGF-I SDS tras un mes. Hay 3,75 veces más individuos con respuesta baja que individuos con respuesta intermedia o alta en niños portadores del genotipo GG (3,75 [1,4-10]).

25 Se ha demostrado que la familia SH2B, a la que pertenece SH2B2, promueve la señalización de insulina. SH2B2, anteriormente conocido como ALS, se identificó inicialmente como un nuevo sustrato receptor de insulina (Moodie SA *et al.*, J Biol Chem. 1999;274(16):11186-93), que se asociaba con fosfotirosinas situadas dentro del bucle de activación del receptor de insulina a través del dominio 2 de homología APS Src. El gen SH2B2 codifica 4 isoformas que funcionan a lo largo de las vías de señalización activadas por el receptor de hormona del crecimiento (GH). Más específicamente, las proteínas SH2B2 se refieren a un suceso iniciador, la activación de JAK2 (cinasa Janus 2), una tirosín-cinasa asociada al receptor de GH. Se ha demostrado que SH2B2beta y/o alfa regulan negativamente la señalización de insulina, así como las respuestas celulares mediadas por JAK2 (Li *et al.*, Endocrinology, 2007, 148:1615-21).

30 rs2906713 (C/G) está ubicado en el cromosoma 7.

En pacientes con TS, 27% (38 de 139) de los niños eran portadores del alelo C para el SNP rs2906713 (en el gen SH2B2).

35 El hecho de portar el alelo C para el SNP rs2906713 tiene un valor predictivo positivo de 63% (24 de 38) en niños con GHD para respuesta baja basada en el cambio de IGF-I SDS tras un mes. Aunque el OR exacto no es significativo en este caso particular, este marcador, en combinación, demuestra tener valor añadido.

40 PIK3CB: La interacción de GH con receptores de GH (GHR, por sus siglas en inglés) en células diana promueve la asociación de la tirosín-cinasa JAK2 celular con GHR. A consecuencia de la fosforilación por tirosina de GHR, se activan múltiples cascadas de señalización, entre las cuales se ha demostrado que las cascadas de fosfatidilinositol-3'-cinasa (PI3K) regulan la transcripción de genes de respuesta a GH (Piwien-Pilipuk G *et al.*, J Pediatr Endocrinol Metab. 2002;15(6):771-86). La PI3K se compone de subunidades que incluyen una subunidad catalítica de 110 kD, que está relacionada con PIK3CB, y una subunidad de adaptador de 85-kD (Hu *et al.*, Mol Cell Biol. 1993;13(12):7677-88). La pérdida de esta subunidad de 110-kD retarda el crecimiento celular, aunque no responde a la estimulación por insulina u otros factores de crecimiento *in vitro* (Jia *et al.*, Nature, 2008, 454: 776-779)

45 rs10513055 (C/A) está localizado en el cromosoma 3.

En pacientes con TS, 26% (36 de 139) de los niños eran portadores del alelo C en el SNP rs10513055 (en el gen PIK3CB).

50 El hecho de portar el alelo C en el SNP rs10513055 tiene un valor predictivo positivo de 61% (22 de 36) en niños con GHD para respuesta baja basada en el cambio de IGF-I SDS tras un mes. Aunque el OR exacto no es significativo en este caso particular, este marcador, en combinación, demuestra tener valor añadido.

El gen CDK4 ha sido descrito funcionalmente más arriba.

rs2069502 (A/G) está ubicado en el cromosoma 12.

En pacientes con TS, 42% (59 de 139) de los niños eran portadores del genotipo GG en el SNP rs2069502 (en el

gen CDK4).

- 5 El hecho de portar el genotipo GG en el SNP rs2069502 tiene un valor predictivo positivo de 91% (54 de 59) en niños con TS para respuesta no alta basada en el cambio de IGF-I SDS tras un mes. Hay 6,4 veces más individuos con respuesta "no alta" que individuos con respuesta alta entre niños portadores de GG que entre los portadores del alelo A (OR = 6,4 [2,22-22,8])

rs2270777 (A/G) está ubicado en el cromosoma 12.

En pacientes con TS, 19% (26 de 139) de los niños eran portadores del genotipo AA para el SNP rs2270777 (en el gen CDK4).

- 10 El hecho de portar el genotipo AA en el SNP de rs2270777 tiene un valor predictivo positivo de 100% (26 de 26) en niños con TS para respuesta no alta basada en el cambio de IGF-I SDS tras un mes. No se pudo evaluar el OR.

En pacientes con TS, la combinación de marcadores BCL2 o SH2B2 incluye portadores del genotipo GG en el SNP rs4456611 (en el gen BCL2) o el alelo C en el SNP rs2906713 (en el gen SH2B2) para 41% (57 de 139) de los niños.

- 15 El hecho de portar el o los marcadores tiene un valor predictivo positivo de 87% (50 de 57) en niños con TS para respuesta no alta basada en el cambio de IGF-I SDS tras un mes. Hay 3,75 veces más individuos con respuesta no alta que individuos con respuesta alta entre niños portadores de marcador o marcadores SH2B2 ó BCL2 que entre los no portadores de marcadores (OR = 3,7 [1,4-10,8])

- 20 En pacientes con TS, la combinación de marcadores BCL2 ó PIK3CB incluye portadores del genotipo GG en el SNP rs4456611 (en el gen BCL2) o del alelo C en el SNP rs10513055 (en el gen PIK3CB) para 38% (53 de 139) de los niños.

- 25 El hecho de portar el o los marcadores tiene un valor predictivo positivo de 87% (46 de 53) en niños con TS para respuesta no alta basada en el cambio de IGF-I SDS tras un mes. Hay 3,14 veces más individuos con respuesta no alta que individuos con respuesta alta en niños portadores de marcador o marcadores PIK3CB ó BCL2 que en no portadores de marcadores (OR = 3,14 [1,2-9,3])

En pacientes con TS, la combinación de marcadores BCL2 ó CDK4 incluye portadores del genotipo GG en el SNP rs4456611 (en el gen BCL2) o genotipo GG en el SNP rs2069502 (en el gen CDK4) para 55% (76 de 139) de los niños.

- 30 El hecho de portar el o los marcadores tiene un valor predictivo positivo de 91% (69 de 76) en niños con TS para respuesta no alta basada en el cambio de IGF-I SDS tras un mes. Hay 7,8 veces más individuos con respuesta no alta que individuos con respuesta alta entre niños portadores de marcadores CDK4 ó BCL2 que entre los no portadores de marcadores (OR = 7,8 [2,9-23,2]).

Tabla 4 SNP asociados a través de análisis continuos

ID de SNP	Nombre de GEN	n° de SNP en el gen	Enfermedad	n° de bloques LD	asociación ensayada	valor p bruto	valor p ajustado	MAF	eficiencia de genotipado
rs2270777	CDK4	2	GHD	1	presencia de alelo principal	0,0052688	0,0052688	0,442771	1
rs2276048	INPL1	2	GHD	1	presencia de alelo raro	0,01669849	0,01669849	0,222892	1
rs970467	LEPR	56	GHD	5	presencia de alelo raro	0,00412864	0,02064321	0,105422	1
rs2270777	CDK4	2	GHD	1	genotipo	0,02087801	0,02087801	0,442771	1
rs970467	LEPR	56	GHD	5	genotipo	0,00443737	0,02218687	0,105422	1
rs1950510	SOS2	10	GHD	4	presencia de alelo raro	0,00596415	0,02385661	0,204819	1
rs6503691	STAT_clúster	10	GHD	2	presencia de alelo principal	0,01370852	0,02741704	0,180723	1
rs5906709	GATA1	1	GHD	1	presencia de alelo raro	0,02793087	0,02793087	0,180723	1
rs9658584	CYR61	2	GHD	1	presencia de alelo principal	0,03500418	0,03500418	0,230303	0,9939759
rs12536500	GRB10	35	GHD	11	genotipo	0,00330749	0,03638242	0,259036	1
rs3856806	PPARG	13	GHD	3	presencia de alelo principal	0,0125	0,0375	0,11747	1
rs5030280	WT1	17	GHD	8	genotipo	0,00499284	0,03994272	0,174699	1
rs2079147	CDK6	45	GHD	10	presencia de alelo raro	0,00412281	0,04122812	0,430723	1
rs1317681	TGFB2	26	GHD	11	genotipo	0,00388797	0,04276762	0,201807	1
rs941798	PTPN1	16	GHD	7	presencia de alelo raro	0,00613797	0,04296576	0,478916	1
rs2888586	SOS1	48	GHD	6	genotipo	0,00780082	0,04680494	0,427711	1
rs4802071	AKT2	3	TS	1	presencia de alelo raro	0,00038173	0,00038173	0,333333	1
rs1526083	PIK3CG	9	TS	5	presencia de alelo raro	0,00017389	0,00086946	0,413194	1
rs4802071	AKT2	3	TS	1	genotipo	0,00104457	0,00104457	0,333333	1
rs2069502	CDK4	2	TS	1	presencia de alelo raro	0,00243028	0,00243028	0,381944	1
rs1526083	PIK3CG	9	TS	5	genotipo	0,00065024	0,0032512	0,413194	1
rs1063169	FOS	2	TS	2	genotipo	0,0024622	0,0049244	0,1875	1
rs12667819	PIK3CG	9	TS	5	presencia de alelo raro	0,00154787	0,00773933	0,46875	1
rs4804428	INSR	38	TS	19	presencia de alelo principal	0,00040895	0,00777014	0,15625	1
rs1063169	FOS	2	TS	2	presencia de alelo principal	0,00500096	0,01000191	0,1875	1
rs2069502	CDK4	2	TS	1	genotipo	0,01068558	0,01068558	0,381944	1
rs12667819	PIK3CG	9	TS	5	genotipo	0,00332068	0,01660341	0,46875	1
rs4988505	GHRHR	8	TS	2	presencia de alelo raro	0,00888972	0,01777944	0,256944	1
rs7960552	PPP1CC	2	TS	2	presencia de alelo principal	0,01210609	0,02421217	0,315972	1
rs7168671	IGF1R	60	TS	31	presencia de alelo raro	0,00086537	0,02682637	0,222222	1

ID de SNP	Nombre de GEN	nº de SNP en el gen	Enfermedad	nº de bloques LD	asociación ensayada	valor p bruto	valor p ajustado	MAF	eficiencia de genotipado
rs4608435	INSR	38	TS	19	genotipo	0,00142942	0,02715897	0,208333	1
rs3817899	IGFALS	1	TS	1	presencia de alelo raro	0,02907913	0,02907913	0,104167	1
rs10513055	PIK3CB	23	TS	5	presencia de alelo raro	0,00591079	0,02955395	0,138889	1
rs2276310	ARRB1	21	TS	8	presencia de alelo raro	0,00369452	0,02955619	0,111111	1
rs2237572	CDK6	45	TS	8	presencia de alelo raro	0,00394108	0,03152864	0,361111	1
rs4608435	INSR	38	TS	19	presencia de alelo raro	0,00174124	0,03308364	0,208333	1
rs4456611	BCL2	122	TS	37	presencia de alelo principal	0,00094031	0,0347914	0,440972	1
rs2270777	CDK4	2	TS	1	presencia de alelo principal	0,03780514	0,03780514	0,364583	1
rs4988505	GHRHR	8	TS	2	genotipo	0,02076109	0,04152218	0,256944	1
rs3891248	MYC	3	TS	3	presencia de alelo principal	0,01421493	0,0426448	0,230769	0,9930555 6
rs1498708	SOCS2	2	TS	1	presencia de alelo raro	0,04604605	0,04604605	0,142361	1
rs17189466	POU1F1	5	TS	1	presencia de alelo principal	0,04648123	0,04648123	0,125	1
rs9913908	PRKCA	71	TS	30	presencia de alelo principal	0,00156034	0,04681028	0,309028	1
rs2741	GHRHR	8	TS	2	presencia de alelo raro	0,0240331	0,0480662	0,142361	1
rs2267922	PIK3R2	1	TS	1	genotipo	0,04896168	0,04896168	0,454861	1
rs2906713	SH2B2	6	TS	2	presencia de alelo raro	0,02450045	0,0490009	0,152778	1

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para identificar el nivel de respuesta a tratamiento con hormona del crecimiento en un individuo que padece deficiencia de hormona del crecimiento (GHD), en donde el método comprende los pasos de:
  - a. determinar si en PTPN1 - rs941798 está presente el genotipo AA en una muestra de ADN obtenida de dicho individuo; y
  - b. predecir, a partir de la presencia del genotipo AA en PTPN1 - rs941798, un nivel de respuesta bajo a tratamiento con hormona del crecimiento.
2. Un método para identificar el nivel de respuesta a tratamiento con hormona del crecimiento en un individuo que padece deficiencia de hormona del crecimiento (GHD), en donde el método comprende los pasos de:
  - a. determinar si en PTPN1 - rs941798 está presente el genotipo AA y en CDK4 - rs2270777 está presente el genotipo GG ó AA en una muestra de ADN obtenida de dicho individuo; y
  - b. predecir, a partir de la presencia del genotipo AA en PTPN1 - rs941798 y de la presencia del genotipo GG ó AA en CDK4 - rs2270777, un nivel bajo de respuesta a tratamiento con hormona del crecimiento.
3. Hormona del crecimiento para uso en el tratamiento de deficiencia de hormona del crecimiento (GHD) en un individuo que lo necesita, en donde el individuo ha sido identificado de acuerdo con el método según la reivindicación 1 ó 2 como individuo con respuesta baja al tratamiento con hormona del crecimiento.
4. Hormona del crecimiento según la reivindicación 3, en donde el individuo es tratado con un análogo de acción prolongada de GH o con una dosis de hormona del crecimiento que está incrementada en comparación con la dosis estándar.
5. Un método según las reivindicaciones 1 ó 2 o una hormona del crecimiento según las reivindicaciones 3 ó 4, en donde la hormona del crecimiento es hormona del crecimiento humana, preferiblemente hormona del crecimiento humana recombinante y más preferiblemente Saizen®.