

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 982**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/74** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**A61K 38/27** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2010 E 10747059 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2015 EP 2473850**

54 Título: **Método para predecir el nivel de respuesta al crecimiento**

30 Prioridad:

**02.09.2009 EP 09169251**

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

**07.09.2015**

73 Titular/es:

**MERCK SERONO S.A. (100.0%)  
Centre Industriel  
1267 Coinsins, CH**

72 Inventor/es:

**THEOCHARIS, THEO;  
LARROQUE, SYLVAIN y  
BERNARD, LAURENCE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 544 982 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

Método para predecir el nivel de respuesta al crecimiento

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a marcadores biológicos y genéticos asociados a la respuesta clínica temprana a la hormona del crecimiento en individuos que padecen deficiencia de la hormona del crecimiento (GHD) o síndrome de Turner (TS). La presente invención se refiere más particularmente a marcadores biológicos y genéticos, que se pueden usar para una predicción más precisa de la respuesta temprana al tratamiento de la deficiencia de la hormona del crecimiento (GHD) o del síndrome de Turner (TS).

10 La invención describe además marcadores biológicos y genéticos específicos que están relacionados con la respuesta temprana de la GHD o el TS al tratamiento con la hormona del crecimiento (GH), así como a las técnicas de predicción basadas en estos marcadores biológicos y genéticos así como a algunas características de los pacientes tratados previamente. Por tanto, la invención se puede usar para predecir la respuesta al tratamiento con la hormona del crecimiento (GH) y para diseñar el mejor tratamiento de la GHD o el TS.

**Antecedentes de la invención**

15 La deficiencia de la hormona del crecimiento (GHD) incluye un grupo de diferentes patologías, todas con una insuficiencia o reducción de la secreción de la hormona del crecimiento (GH). La GHD puede darse sola o en combinación con otras deficiencias de las hormonas de la glándula pituitaria. Puede ser congénita o adquirida como resultado de un traumatismo, infiltraciones, tumores o terapia de radiación. A pesar del gran número de etiologías posibles, la mayoría de los niños padecen GHD idiopática. Dependiendo de los criterios de diagnóstico, se ha estimado en diversos estudios (PC Sizonenko et al., *Growth Horm. IGF Res.* 2001; 11(3):137-165) que la incidencia de baja estatura asociada a la GHD infantil grave varía entre 1:4000 y 1:10000 niños vivos.

20 El crecimiento postnatal de los niños con GHD difiere de acuerdo con la etiología. La deficiencia genética de la GHD provoca una ralentización progresiva del crecimiento después de un crecimiento normal en los primeros meses de vida. La insuficiencia de crecimiento es el principal signo que se presenta en la GHD en niños y la falta de terapia con GH en el caso de GHD grave conduce a una estatura muy baja en la edad adulta (GH Research Society, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 2000; 85(11):3990-3993).

25 El síndrome de Turner (o Ullrich-Turner) (TS) es una anomalía cromosómica caracterizada por la ausencia del cromosoma X completo o una delección en dicho cromosoma. El TS afecta a una de cada 1500 a 2500 niñas nacidas vivas. En el 95% de las chicas con TS se observa una baja estatura y una altura final reducida. La diferencia media entre la altura media de adulta de mujeres normales y de las mujeres adultas con TS es de 20 cm (Park E. et al., *Pediatr. Res.* 1983; 17:1-7). La altura final reducida se debe a un descenso de la velocidad de crecimiento después de los 5 o 6 años (con relación a las niñas no afectadas) y a la ausencia de un estirón puberal (Brook CGD et al., *Arch. Dis. Child* 1974; 49:789-795) debido a la falta del aumento normal de la secreción de la GH observada durante la pubertad. La baja estatura en el TS no es atribuible a secreciones deficientes de la GH o del factor del crecimiento insulinoide de tipo 1 (IGF-I) (Cutlet L. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1985; 60:1087-1092), sino que se ha documentado en estos pacientes una menor amplitud y frecuencia de impulsos de la GH después de los 8 años (Ross JL et al., *J. Pediatr.* 1985; 106:202-206).

30 La hormona del crecimiento (GH) humana procedente de DNA recombinante es el único fármaco aprobado específicamente para el tratamiento de la insuficiencia del crecimiento y baja estatura infantil, tales como GHD, SGA (pequeño para su edad gestacional) y TS. Los regímenes de dosis actuales para la terapia infantil con la GH se basan en el peso y proceden principalmente de la experiencia empírica.

35 La respuesta al tratamiento con la GH, tanto a corto plazo como a largo plazo, demuestra una considerable variabilidad entre individuos. Esto es particularmente evidente al finalizar la administración pediátrica de la GH, es decir la respuesta del crecimiento, que varía significativamente en sujetos con síndrome de Turner, pero es también pronunciada en niños afectados por GHD.

40 Esta variabilidad se puede investigar a dos niveles diferentes. El primero, al nivel fenotípico, valorando la respuesta del crecimiento individual a la administración de la GH por medio de los marcadores biológicos de la acción de la GH usada generalmente en el tratamiento clínico de sujetos de baja estatura. El segundo, al nivel genotípico, que puede investigarse identificando los factores genéticos responsables de la variación fenotípica de la respuesta a la intervención de la GH.

45 Los modelos de predicción del crecimiento pretenden predecir la respuesta individual al tratamiento con la hormona del crecimiento basándose bien en las características de un tratamiento previo o en la respuesta después de un corto periodo de administración de la hormona del crecimiento en comparación con la respuesta del grupo. Los parámetros del tratamiento previo utilizados en los modelos de predicción existentes en los niños con GHD idiopática o síndrome de Turner que recibieron terapia con GH incluyen criterios auxológicos, índices de secreción endógena de GH, marcadores biológicos de la acción de la GH, tales como los factores del crecimiento insulinoideos (IGF) y sus

proteínas de unión (IGFBP), y marcadores de recambio óseo.

5 Ranke et al., (*J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999; 84(4):1174-1183) propusieron un modelo de predicción para la respuesta del crecimiento el primer año en niños prepuberales con GHD usando criterios auxológicos, valores máximos de la GH en ensayos de estimulación con la GH y respuesta de la velocidad de crecimiento (HV). El análisis de los datos sugirió que el primer año el HV estaba correlacionado negativamente con la edad y con la puntuación de la desviación estándar de la altura (HSDS) y correlacionado positivamente con el peso al nacer, el peso al comienzo de la terapia, la dosis de la GH, la frecuencia de inyección, la HSDS objetivo y la respuesta máxima a la GH en un ensayo de estimulación. Cole et al., (*Arch. Dis. Child* 2004; 89:1024-1027) documentaron que el resultado del ensayo de estimulación con la GH, aunque no es un método de referencia para la diagnosis, es un valioso predictor del crecimiento en el primer año de tratamiento. Blethen et al., (*J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993; 76(3):574-579) documentaron que la respuesta inicial a la terapia con la GH puede ser predicha por la edad, grado de GHD, peso ajustado a la altura, dosis de la GH, frecuencia de inyecciones y altura parental media. El modelo de Ranke se amplió para examinar la respuesta de crecimiento el segundo, tercero y cuarto año y demostró que la velocidad de crecimiento el primer año es el predictor más importante del crecimiento posterior. En general, el modelo podría explicar el 61% de la variabilidad de la respuesta del crecimiento durante el primer año de tratamiento con la GH. Un modelo similar, basado en parámetros auxológicos, podría explicar el 46% de la respuesta de crecimiento al tratamiento con la GH en sujetos con TS (Ranke et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000; 85(11):4212-4218).

10 Los modelos de predicción del crecimiento tienen un poder predictor variable y aunque adecuados para describir la varianza dentro de una cohorte definida de pacientes, no pueden explicar la varianza total de la respuesta a la GH. Los contribuyentes principales a la varianza restante son determinantes posiblemente genéticos.

Se necesita por tanto definir un conjunto de marcadores biológicos y marcadores genéticos/genómicos asociado con la respuesta al tratamiento con la GH a corto plazo que pueda complementar los parámetros previamente identificados para aumentar la precisión con la que pueda predecirse la respuesta al tratamiento con la GH.

### Sumario de la invención

25 De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para predecir el nivel de respuesta después de un mes de tratamiento con la hormona del crecimiento en un individuo que padezca deficiencia de la hormona del crecimiento o síndrome de Turner usando marcadores biológicos y genéticos.

Basándose en la respuesta clínica predicha se puede optimizar el tratamiento de pacientes con deficiencia de la hormona del crecimiento o síndrome de Turner.

### 30 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona nuevos métodos para predecir la respuesta al tratamiento con la hormona del crecimiento (GH) en individuos que tienen deficiencia idiopática de la hormona del crecimiento (GHD) o síndrome de Turner (TS), permitiendo con ello el ajuste de la dosis necesaria de la GH de manera individualizada para cada paciente.

35 Los medicamentos usuales para estimular el crecimiento lineal con la GH en la GHD y el TS incluyen SAIZEN®. El ingrediente activo de SAIZEN® es somatropina, una hormona del crecimiento humana recombinante (r-hGH) producida por células de mamíferos modificadas genéticamente (C127 de ratón). La somatropina es una proteína no glicosilada monocatenaria de 191 aminoácidos con dos puentes disulfuro.

El SAIZEN® está registrado en muchas zonas con las siguientes indicaciones pediátricas:

- 40 ○ insuficiencia del crecimiento en niños causada por la disminución o ausencia de secreción de la hormona del crecimiento endógena (GHD)
- insuficiencia del crecimiento en niños debido a causas distintas de la GHD (síndrome de Turner, alteración del crecimiento en niños nacidos pequeños para su edad gestacional (SGA))
- insuficiencia del crecimiento en niños prepuberales debido a insuficiencia renal crónica.

45 El SAIZEN® también está registrado en 42 países, incluyendo 15 países de la Unión Europea y Suiza, con la indicación de "deficiencia pronunciada de la hormona del crecimiento" en adultos.

Se pretende que el término "hormona del crecimiento (GH)", como se usa en la presente memoria, incluya la hormona del crecimiento en particular de origen humano, tal como se obtiene por aislamiento de fluidos biológicos o por técnicas de DNA recombinante de células hospedantes procariotas o eucariotas, así como sus sales, derivados funcionales, variantes, análogos y fragmentos activos.

50 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 posteriores de la GH que dan como resultado la activación o inhibición de una

variedad de diferentes vías de señalización intracelular, responsables de diferentes efectos biológicos de la GH. A nivel celular, la GH se une a un solo receptor, pero activa múltiples respuestas dentro de células diana individuales. Los genes responsables de la GH incluyen IGF-I, que es el mediador principal 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. Por administración de la GH exógena, los efectos sobre el crecimiento somático se producen a largo plazo, pero a corto plazo pueden ser evaluados por una variedad de marcadores en la sangre periférica que reflejan el inicio de su acción biológica.

La hormona del crecimiento humana recombinante se puede administrar típicamente a niños a una dosificación diaria que varía desde aproximadamente 0,02 mg/kg/día de peso hasta aproximadamente 0,07 mg/kg/día de peso. Esta dosificación se puede administrar diariamente o acumular en una dosis semanal o la dosis acumulada semanalmente se puede dividir en 3 o 6 dosis iguales a la semana.

La respuesta al tratamiento con la GH, tanto a corto como a largo plazo, presenta considerable variabilidad entre individuos. Esto es particularmente evidente al finalizar la administración pediátrica de la GH, es decir la respuesta del crecimiento, que varía significativamente entre sujetos con TS pero es también pronunciada entre niños afectados por GHD.

Esta variabilidad se puede investigar a dos niveles diferentes. El primero, a nivel de marcadores biológicos, valorando la respuesta individual del crecimiento a la administración de la GH por medio de los marcadores biológicos de la acción de la GH usados generalmente en el tratamiento clínico de sujetos de baja estatura, como se describe con más detalle a continuación. El segundo, a nivel del genotipo, que se puede investigar identificando los factores genéticos responsables de la variación de los marcadores biológicos asociados a la respuesta a la intervención de la GH.

Los modelos clínicos de predicción del crecimiento existentes tratan de predecir la respuesta individual al tratamiento con la GH basándose en las características del tratamiento previo y/o en la respuesta clínica después de un periodo corto de administración de la GH en comparación con la respuesta del grupo. Los parámetros del tratamiento previo usados en los modelos de predicción existentes para los niños con GHD idiopática y síndrome de Turner que reciben terapia con la GH incluyen criterios auxológicos, tales como altura en el punto de partida, altura parental media, peso al nacer, longitud al nacer, velocidad de crecimiento, etc., índices de secreción de la GH endógena, marcadores biológicos de la acción de la GH, tales como los factores de crecimiento insulinoideos (IGF) y sus proteínas de unión (IGFBP), y marcadores de recambio óseo.

Los modelos clínicos de predicción del crecimiento existentes tienen un poder predictor variable y aunque adecuados para describir la varianza en una cohorte definida de pacientes, no pueden explicar la varianza total de la respuesta a la GH. Los contribuyentes principales a la varianza restante son determinantes posiblemente genéticos.

En los últimos años, la farmacogenómica – incluida la farmacogenética, como se describe en la presente solicitud de patente – (PGx) ha atraído la atención de los médicos. La farmacogenética puede ser considerada como el estudio de las variaciones interindividuales de la secuencia de DNA relacionadas con la respuesta a fármacos. En este contexto, el genoma de un individuo se analiza acudiendo a la descripción de marcadores genéticos o en este sentido a las alteraciones significativas de la sensibilidad.

De acuerdo con la presente invención, la variabilidad de la respuesta a la GH se valoró midiendo marcadores biológicos de la acción de la hormona del crecimiento y detectando determinantes genéticos relacionados potencialmente con los cambios tempranos en niveles de IGF-I en niños con GHD y TS tratados con la GH y cambios en niveles de IGFBP3 en niños con TS. Este método es importante no sólo para evaluar la respuesta a la eficacia del tratamiento con la GH sino también el perfil de seguridad del tratamiento y las potenciales consecuencias a largo plazo. Está documentado que los efectos secundarios potenciales del tratamiento con GH incluyen cambios en la insensibilidad a la insulina y por tanto el desarrollo de mejor tolerancia a la glucosa, que puede ser monitorizada y representada por mediciones estándares clínicas y de laboratorio. En este contexto, la identificación de los marcadores biológicos y determinantes genéticos permitirá la predicción de la respuesta individual a la administración de la GH y así la estratificación de los pacientes para la administración del fármaco.

En este estudio, los componentes del sistema de IGF, incluyendo las proteínas de unión al IGF, se han seleccionado como marcadores de eficacia primaria. El IGF-I es el marcador de la eficacia bioquímica a la exposición a la GH más usado generalmente (De Boer H. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996; 81(4):1371-1377). La inducción del IGF-I inducida por la GH es rápida y alcanza su máximo unas cuantas semanas después de la administración de la GH.

Muchos efectos de la GH están mediados indirectamente por el IGF-I, que es producido principalmente en el hígado. Existen seis proteínas de unión al IGF conocidas, de las cuales la IGFBP3 es la más abundante en la circulación y supone el 80% de todas las proteínas de unión al IGF. Los niveles tanto de IGF-I como de IGFBP3 dependen considerablemente de los niveles de la GH; por tanto, en la GHD ambas mediciones son bajas. El IGF-I y la IGFBP3 no son independientes entre sí – generalmente muestran una relación, que es particularmente estrecha en niños.

Los niveles de IGF-I varían hasta un grado mayor con la GH bien endógena o exógena que los niveles de la IGFBP3, que son más estables en el tiempo. Una concentración baja en suero de IGF-I o IGFBP3 antes del trata-

miento o una puntuación de la desviación estándar (SDS) predice una buena respuesta durante el primer año de tratamiento en niños con GHD, mientras que 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 (IGFBP3) bajo el tratamiento con la GH están correlacionados con los niveles en el punto de partida y el estado auxológico, la secreción de la GH endógena, la dosis de la GH y la respuesta inicial de la velocidad de crecimiento.

El IGF-I y la IGFBP3 se denominan en la presente memoria marcadores de la eficacia.

En los ajustes actuales, los niveles de la SDS del IGF-I y los niveles de la SDS de la IGFBP3 se evalúan entre el punto de partida, poco antes de la iniciación del tratamiento con la GH, y después de 1 mes de tratamiento con la GH.

Para comprender los factores genéticos que subyacen en las enfermedades hereditarias o la respuesta a un tratamiento farmacológico, la genética clásica examina un solo gen o un grupo de unos pocos genes de interés relacionado con el rasgo asociado a las enfermedades hereditarias o a la respuesta al tratamiento farmacológico. La genómica, por otro lado, estudia el resultado de esta búsqueda de determinantes genéticos lo que da como resultado las características fenotípicas particulares al nivel del genoma completo. En el presente estudio, se usaron las siguientes técnicas genómicas:

Genotipificación: por medio de la identificación de las variaciones del DNA, este método se usó para detectar los determinantes genéticos en genes candidatos que están relacionados potencialmente con la GHD, el TS o los diferentes índices de respuestas al tratamiento con la GH en estas dos enfermedades. La búsqueda de las variantes del DNA se realizó usando polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) como marcadores genéticos. Un SNP es un locus en el DNA en el que la secuencia de DNA de dos individuos que llevan alelos distintos difiere en un solo nucleótido.

Los SNP son los polimorfismos genéticos humanos más comunes y su densidad en el genoma es muy alta. Se han descubierto y caracterizado hasta ahora casi 1,8 millones de SNP y están públicamente disponibles en varias bases de datos importantes ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org), October 2004). La identificación de los SNP de interés de acuerdo con esta invención se puede realizar con un método desarrollado por Affymetrix o una técnica comparable (Matsuzaki H. et al., *Genome Research* 2004; 14:414-425). Una asociación entre la presencia o ausencia de un marcador genético (o un conjunto de marcadores genéticos denominado un haplotipo) y una enfermedad o respuesta a un tratamiento (el fenotipo) indica que un gen sensible a la enfermedad – o respuesta – puede estar situado en la proximidad del marcador. Esta asociación se detecta como una diferencia significativa en la frecuencia de un alelo particular en un locus del SNP (o la diferencia en la frecuencia de un haplotipo) entre grupos de pacientes con diferentes fenotipos. Esta asociación se puede detectar bien considerando el estado heterocigótico y homocigótico de los alelos para un SNP dado, llamada asociación genotípica, o basándose en la presencia de uno u otro alelo para un SNP dado, llamada asociación alélica. Estos análisis de las asociaciones se realizan con métodos estadísticos no paramétricos, el ensayo de Krustal Wallis para la asociación genotípica y el ensayo exacto de Mann Whitney para la alélica.

Una vez que se ha encontrado un SNP que está asociado a una enfermedad o respuesta a un tratamiento, se requiere un análisis predictor inequívoco para determinar además que alelo se asocia mejor a la respuesta al tratamiento y por consiguiente podría servir como marcador predictor. Este análisis inequívoco se realiza con el ensayo exacto de Fisher para examinar la importancia de la asociación entre dos variables, la respuesta (baja o alta) y el genotipo, en una tabla de contingencia 2 x 2. En una validación adicional de estos hallazgos, se integra la población intermedia y los ensayos son repetidos esta vez en una tabla de contingencia 2 x 3.

Por otra parte, se seleccionan marcadores genéticos predictores basándose en un valor p de Fisher inferior al 5% y un umbral de especificidad superior al 80%. La frecuencia alélica genética en la población de estudio debe ser superior al 10%.

Se incluyen el índice de probabilidad exacto junto con el intervalo de confianza asociado indicado entre paréntesis así como los valores positivos predictores.

También se tuvo en cuenta la combinación de 2 marcadores genéticos de estratificación individuales por medio del término “y” o por medio del término “o”, en o a lo largo de la línea de la lógica booleana, es decir que requiere que estén presentes cada marcador o ambos marcadores.

Se realizan análisis inequívocos complementarios para marcadores significativos, considerando la población total, definidos por tres grupos: respondedores malos, respondedores buenos y grupo intermedio (ni malos ni buenos).

Los términos “rasgo” y “fenotipo” se pueden usar intercambiamente y se refieren a cualquier propiedad de un organismo clínicamente distinguible, detectable o medible de cualquier otro modo, tales como por ejemplo síntomas de una enfermedad o sensibilidad a ella. Típicamente los términos “rasgo” o “fenotipo” se usan para referirse a síntomas de la GHD o del TS o sensibilidad a ellos; o para referirse a una respuesta de individuos a un fármaco que actúa contra la GHD o el TS.

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 difieren de otras formas en su secuencia de nucleótidos. Típicamente, el alelo identificado más frecuentemente se denomina alelo principal mientras que el otro u otros alelos se denominan alelo o alelos secundarios. Los organismos diploides pueden ser homocigóticos o heterocigótico para una forma alélica.

5 El término “polimorfismo” como se usa en la presente memoria se refiere a la existencia de dos o más secuencias genómicas o alelos alternativos entre o dentro de diferentes genomas o individuos. “Polimórfico” se refiere al estado en el que pueden encontrarse en una población dos o más variantes de una secuencia genómica específica. Un “sitio polimórfico” es el locus en el que tiene lugar dicha variación. Un polimorfismo puede comprender una sustitución, deleción o inserción de uno o más nucleótidos. Un “polimorfismo de un solo nucleótido” (SNP) es un cambio de un solo par de bases. Típicamente, un polimorfismo de un solo nucleótido es la sustitución de un nucleótido por otro nucleótido en el sitio polimórfico.

Como se analizará a continuación con más detalle, la alteración (“alteración de la sensibilidad”) en un gen o polipéptido de acuerdo con la invención puede ser cualquier alteración de nucleótidos o aminoácidos asociada a la respuesta al tratamiento con la hormona del crecimiento (GH) de niños con GHD o TS.

15 Un marcador alélico se define como un marcador en el que está presente el alelo principal homocigótica o heterocigóticamente.

Un marcador genotípico se define por una asociación entre la respuesta y al menos uno de los tres genotipos posibles, homocigótico para el alelo principal, homocigótico para el alelo secundario o heterocigótico.

Los marcadores se seleccionan basándose en análisis genéticos continuos en toda la población de estudio separada en una población con GHD y una población con TS.

20 Una sensibilidad puede ser cualquier forma de mutación(es), deleción(es), transposición(es) y/o inserción(es) en la región codificadora y/o no codificadora del gen, aislada o en diversas combinaciones. Las mutaciones incluyen más específicamente mutaciones puntuales. Las deleciones pueden abarcar cualquier región de uno o más residuos en una porción codificadora o no codificadora del gen. Las deleciones típicas afectan a pequeñas regiones, tales como dominios (intrones) o secuencias o fragmentos repetidos de menos de aproximadamente 50 pares de bases consecutivos, aunque también pueden ocurrir deleciones mayores. Las inserciones pueden comprender típicamente una adición en el gen de entre 1 y 50 pares de bases. Las transposiciones incluyen, por ejemplo, inversiones de secuencias. Una alteración también puede ser una modificación anómala de la secuencia de polinucleótidos y puede ser silenciosa (es decir, no crear modificación en la secuencia de aminoácidos de la proteína) o puede dar como resultado, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos, mutaciones del marco de lectura, codones de parada, corte y empalme de RNA, por ejemplo la presencia de un modelo de corte y empalme de tipo no natural de un transcrito de RNA mensajero o inestabilidad de RNA o de la proteína o un nivel de tipo no natural del polipéptido. También, la alteración puede dar como resultado la producción de un polipéptido con la función o estabilidad alterada, o provocar una reducción o un aumento de los niveles de expresión de la proteína.

30 Las alteraciones de la sensibilidad o los marcadores genéticos típicos son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que se han descrito antes.

La presencia de una alteración en un gen se puede detectar por cualquier método conocido *per se* por los expertos en la técnica, incluyendo secuenciación, pirosecuenciación, hibridación selectiva, amplificación selectiva y/o espectrometría de masas incluyendo la espectrometría de masas mediante desorción por láser asistida por matriz/ionización mediante un sistema de tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS). En una realización particular, la alteración se detecta por amplificación selectiva de ácidos nucleicos usando uno o varios cebadores específicos. La alteración se detecta por hibridación selectiva usando una o varias sondas específicas.

45 Otras técnicas incluyen métodos de genotipificación basados en electroforesis en gel, tal como análisis por PCR asociada al polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), PCR múltiple, ensayo de ligamiento de oligonucleótidos y minisequenciación; tecnologías de genotipificación basadas en colorantes fluorescentes, tales como ensayos de ligamiento de oligonucleótidos, pirosecuenciación, extensión de una sola base con detección de la fluorescencia, hibridación en solución homogénea, tal como TaqMan, y genotipificación de la baliza molecular; ensayos de amplificación en círculo rodante y ensayo Invader, así como tecnologías de micromatrices basadas en chips de DNA y genotipificación por espectrometría de masas.

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

La secuenciación se puede realizar usando métodos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, usando secuenciadores automáticos. La secuenciación se puede realizar en el gen completo o, más preferiblemente, en sus dominios específicos, típicamente los que se sabe o se sospecha que llevan mutaciones perjudiciales u otras alteraciones.

55 La amplificación se puede realizar de acuerdo con diversos métodos conocidos en la técnica, tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa (LCR) y amplificación por desplazamiento de cadenas (SDA). Estas técnicas se pueden realizar usando reactivos y protocolos comercialmente disponibles. Una técnica

ca preferida es la PCR específica de alelos.

Se debe interpretar que el término "gen" como se usa en la presente memoria incluye cualquier tipo de región de ácidos nucleicos codificante, incluyendo DNA genómico (gDNA), DNA complementario (cDNA), DNA sintético o semi-sintético, cualquier forma de RNA correspondiente (por ejemplo, mRNA), etc., así como secuencias no codificadoras, tales como intrones, secuencias no traducidas en 5' o 3' o secuencias reguladoras (por ejemplo, promotoras o potenciadoras), etc. El término gen incluye particularmente ácidos nucleicos recombinantes, es decir, cualquier molécula de ácidos nucleicos no natural creada artificialmente, por ejemplo, por ensamblaje, corte, ligamiento o amplificación de secuencias. Un gen es típicamente bicatenario, aunque se pueden considerar otras formas, tal como monocatenario. Los genes se pueden obtener de diversas fuentes y de acuerdo con diversos métodos conocidos en la técnica, tales como cribado de genotecas de DNA o por amplificación de diversas fuentes naturales. Los ácidos nucleicos recombinantes se pueden preparar por técnicas convencionales, incluyendo síntesis química, modificación genética, técnicas enzimáticas o una de sus combinaciones. El término "gen" puede comprender una y todas las variantes por corte y empalme de dicho gen.

El término "polipéptido" designa, en el contexto de esta invención, un polímero de aminoácidos sin relación con la longitud del polímero; así, están incluidos en la definición de polipéptido, péptidos, oligopéptidos y proteínas. 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 incluye también modificaciones posteriores a la traducción o a la expresión de polipéptidos, por ejemplo, polipéptidos que incluyen la unión covalente de grupos glicosílicos, grupos acetílicos, grupos fosfato, grupos lipídicos y similares están expresamente abarcados por el término polipéptido. También incluidos en la definición están las variantes de polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, aminoácidos que solo existen de forma natural en un sistema biológico no relacionado, aminoácidos modificados procedentes de sistemas de mamíferos, etc.), polipéptidos con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto que existan de forma natural como que no.

El término "tratar" o "tratamiento" como se usa en la presente memoria se entiende que es para mejorar, aliviar síntomas, eliminar la causa de los síntomas de forma temporal o permanente, o para prevenir o ralentizar la aparición de síntomas del trastorno o afección considerado. El término "tratamiento" como se usa en la presente memoria abarca también el término "prevención del trastorno", que se manifiesta, por ejemplo, retrasando el inicio de los síntomas del trastorno hasta un grado médicamente significativo. El tratamiento del trastorno se manifiesta, por ejemplo, por una disminución de los síntomas asociados al trastorno o una mejora de la nueva aparición de los síntomas del trastorno.

Se entiende que la "respuesta" al tratamiento con la hormona del crecimiento de un individuo que padece GHD o TS en el sentido de la presente invención es la actividad residual de la enfermedad debido al tratamiento con la hormona del crecimiento. Más específicamente, la actividad residual de la enfermedad se asocia en la presente memoria a cambios en los biomarcadores en función de la administración de la GH a estos individuos que padecen GHD o TS.

Los respondedores malos de acuerdo con la presente invención muestran una respuesta de baja magnitud en el cambio del nivel de IGF-I o el nivel de IGFBP-3 (por debajo del percentil 25º) entre el valor en el punto de partida y el de 1 mes. Los respondedores buenos de acuerdo con la presente invención muestran una respuesta de alta magnitud en el cambio del nivel de IGF-I o el nivel de IGFBP-3 (por encima del percentil 75º) entre el valor en el punto de partida y el de después del tratamiento a corto plazo (por ejemplo, 1 mes).

El término "respondedores buenos" se refiere a los individuos que se pueden identificar por mostrar mejor respuesta al tratamiento con la hormona del crecimiento en comparación con la población con GHD o TS que presenta un nivel de respuesta medio al tratamiento con la hormona del crecimiento. La "respuesta buena" se presenta por la reducción de la actividad residual de la enfermedad. Más específicamente, la actividad residual de la enfermedad en los "respondedores buenos" se asocia en la presente memoria a cambios en los biomarcadores en función de la administración de la GH a estos individuos que padecen GHD o TS.

El término "respondedores malos" se refiere a individuos que se pueden identificar por mostrar peor respuesta al tratamiento con la hormona del crecimiento en comparación con la población con GHD o TS que presenta un nivel de respuesta medio al tratamiento con la hormona del crecimiento. La "respuesta mala" se presenta por el aumento de la actividad residual de la enfermedad. Más específicamente la actividad residual de la enfermedad en los "respondedores malos" se asocia en la presente memoria a cambios en los biomarcadores en función de la administración de la GH a estos individuos que padecen GHD o TS.

La presente invención surge del análisis farmacogenómico que evalúa las variaciones génicas en un grupo de 310 pacientes con GHD y TS.

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

- los respondedores malos se representan en la presente memoria por el primer y menor cuartil (denominado Q1) también denominado el menor del 25% de los datos (percentil 25°);
  - los respondedores buenos se representan en la presente memoria por el tercer y superior cuartil (denominado Q3) también denominado el mayor del 75% (percentil 75°);
- 5 - el grupo intermedio se representa en la presente memoria como los datos >Q1 y <Q3 también designado como el intermedio del 50% de los datos

en GHD y TS. A continuación, el índice de probabilidad (OR) describe la diferencia entre las categorías extremas (Q1 y Q3); a menos que se especifique lo contrario.

Los valores de corte para definir las respuestas malas y buenas fueron:

- 10 En GHD: Mala: <0,81 de cambio de nivel de la SDS de IGF-I en un mes  
Buena: >1,91 de cambio de nivel de la SDS de IGF-I en un mes
- En TS: Mala: <1,15 de cambio de nivel de la SDS de IGF-I en un mes  
Buena: >2,63 de cambio de nivel de la SDS de IGF-I en un mes

### SDS del IGF-I en la GHD

15 Los resultados del estudio de acuerdo con la invención muestran que para la población con GHD se puede predecir el nivel de IGF-I después de un mes de tratamiento con la hormona del crecimiento basándose en la SDS del IGF-I en el punto de partida del tratamiento, el cumplimiento del tratamiento en porcentaje de dosis esperada/dosis planificada durante el primer mes de tratamiento, la SDS del peso en el punto de partida del tratamiento, la dosis media de hormona del crecimiento prescrita en µg/kg de peso/día y la edad en años.

20 El nivel de respuesta después de un mes de tratamiento con la hormona del crecimiento se expresa en esta realización como la puntuación de la desviación estándar (SDS) predicha del IGF-I después de un mes. La SDS del IGF-I es un marcador eficaz de la respuesta del crecimiento.

El punto de partida de acuerdo con la invención se define como las características clínicas y biológicas del paciente antes de iniciación del tratamiento.

25 La abreviatura de la SDS predicha del IGF-I después de un mes de tratamiento con la hormona del crecimiento usada en la presente memoria es IGF-I\_SDS\_1M.

La abreviatura de la SDS del IGF-I en el punto de partida del tratamiento usada en la presente memoria es IGF-I\_SDS\_B y además se define más adelante en la Tabla 1.

30 El cumplimiento del tratamiento en porcentaje de dosis esperada/dosis planificada durante el primer mes de tratamiento se abrevia en la presente memoria como cumplimiento. El cumplimiento es ajustado por el médico al comienzo del tratamiento. Además se define más adelante en la Tabla 1.

La abreviatura de la SDS del peso en el punto de partida del tratamiento usada en la presente memoria es bl\_wt SDS y se expresa en kg. Además se define más adelante en la Tabla 1.

35 La dosis media prescrita de la hormona del crecimiento en µg/kg de peso/día se abrevia en la presente memoria como dosis. La dosis es prescrita por el médico que trata al individuo de acuerdo con la dosis aprobada en los países que participan en el estudio.

La edad cronológica en años se abrevia en la presente memoria como edad y además se define más adelante en la Tabla 1.

40 La presente invención se refiere por tanto, en una primera realización, a un método para predecir el nivel de respuesta al tratamiento con la hormona del crecimiento en un individuo que padezca la deficiencia de la hormona del crecimiento (GHD), comprendiendo dicho método las etapas de:

- a. identificar que el individuo tiene
  - el genotipo AA en la quinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4)\_rs2270777; o
  - el alelo A en el receptor de leptina (LEPR)\_rs970467;
- 45 b. identificar la puntuación de la desviación estándar (SDS) del factor de crecimiento insulinoide I (IGF-I) en el punto de partida del tratamiento ("IGF-I\_SDS\_B");
- c. ajustar el cumplimiento del tratamiento en porcentaje de dosis esperada/dosis planificada durante el primer mes de tratamiento ("cumplimiento");
- d. medir la SDS del peso en el punto de partida del tratamiento ("bl\_wt SDS");
- 50 e. ajustar la dosis media prescrita de la hormona del crecimiento en µg/kg de peso/día ("dosis");
- f. aportar la edad en años ("edad"); y
- g. calcular la SDS predicha del IGF-I después de un mes de tratamiento con la hormona del crecimiento con la fórmula  $IGF-I\_SDS\_1M = - 4,7265 + (0,7065 \times IGF-I\_SDS\_B) + (0,0423 \times \text{"cumplimiento"}) + (0,2446 \times bl\_wt$



SDS) + (0,0402 x "dosis") + (0,057 x "edad"),

en donde de acuerdo con el nivel de respuesta, el paciente puede ser tratado con la hormona del crecimiento de acuerdo con un plan de cumplimiento y tratamiento optimizado, siempre que todas las etapas de identificación y medición se realicen *in vitro*.

- 5 Preferiblemente, este método se refiere a la predicción del nivel de respuesta después de 1 mes de tratamiento con la hormona del crecimiento. El método se refiere a la predicción de la SDS del IGF-I después de un mes de tratamiento con la hormona del crecimiento.

El método de acuerdo con la invención no incluye ninguna etapa invasiva en el cuerpo del individuo.

- 10 El método de predicción no tiene en cuenta ningún marcador genético que represente el 66% de la variabilidad ( $R^2$  ajustada) en la SDS del IGF-I en 1 mes; excluyendo tres valores atípicos se obtuvo una  $R^2$  ajustada del 76%.

### Marcadores genómicos

En pacientes con el genotipo AA en CDK4\_rs2270777, el método de predicción representa el 81% de la variabilidad de la SDS del IGF-I en 1 mes.

- 15 En pacientes con el alelo A en LEPR\_rs970467, el método de predicción representa el 71% de la variabilidad de la SDS del IGF-I en 1 mes.

### SDS del IGF-I en el TS

- 20 Los resultados de los estudios muestran también que para la población con TS se puede predecir el nivel de IGF-I después de un mes de tratamiento con la hormona del crecimiento basándose en la SDS del IGF-I en el punto de partida del tratamiento, la concentración de triglicéridos en ayunas en el punto de partida en mmol/L, la SDS del peso del individuo al nacer, la SDS del peso en el punto de partida del tratamiento, la presencia o ausencia de terapia tiroidea y la dosis media prescrita de la hormona del crecimiento en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso/día.

El nivel de respuesta después de un mes de tratamiento con la hormona del crecimiento se expresa en esta realización como la puntuación de la desviación estándar (SDS) predicha del IGF-I después de un mes. La SDS del IGF-I es un marcador de la eficacia de la respuesta de crecimiento.

- 25 La abreviatura de la SDS predicha del IGF-I después de un mes de tratamiento con la hormona del crecimiento usada en la presente memoria es IGF-I\_SDS\_1M.

La abreviatura de la SDS del IGF-I en el punto de partida del tratamiento usada en la presente memoria es IGF-I\_SDS\_B como se ha descrito anteriormente.

- 30 La concentración de triglicéridos en ayunas en el punto de partida en mmol/L se abrevia en la presente memoria como triglicéridos. Los niveles de triglicéridos en ayunas se miden después de unas cuantas horas en ayunas, generalmente después de 4-12 horas en ayunas, preferiblemente después de 8-12 horas en ayunas.

La abreviatura de la SDS del peso al nacer usada en la presente memoria es birth\_wt SDS y se define además en la Tabla 1.

- 35 La abreviatura de la SDS del peso en el punto de partida del tratamiento usada en la presente memoria es bl\_wt SDS como se ha descrito anteriormente.

- 40 La abreviatura de la terapia tiroidea usada en la presente memoria es HORM-REPL y significa que el paciente está sometido a terapia estable sustitutiva con hormona tiroidea para el hipertiroidismo durante la terapia con la hormona del crecimiento. Si la terapia tiroidea se planifica durante la terapia con la hormona del crecimiento, el valor de HORM-REPL es 1. Si no se planifica la terapia tiroidea durante la terapia con la hormona del crecimiento el valor de HORM-REPL es 0.

La dosis media de la hormona del crecimiento prescrita en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso/día se abrevia en la presente memoria como dosis, como se ha descrito anteriormente.

- 45 Un método para predecir el nivel de respuesta al tratamiento con la hormona del crecimiento en un individuo que padezca el síndrome de Turner (TS) comprende las etapas de:

- a. identificar la SDS del IGF-I en el punto de partida del tratamiento ("IGF-I\_SDS\_B");
  - b. medir la concentración de triglicéridos en ayunas en el punto de partida en mmol/L ("triglicéridos");
  - c. aportar la SDS del peso al nacer ("birth\_wt SDS");
  - d. medir la SDS del peso en el punto de partida del tratamiento ("bl\_wt SDS");
  - e. identificar la presencia o ausencia de terapia tiroidea ("HORM-REPL"), en donde la HORM-REPL es 1 si la terapia tiroidea está planificada en el individuo durante el tratamiento con la hormona del crecimiento y en donde "HORM-REPL" es 0 si la terapia tiroidea no está planificada durante la terapia con la hormona del crecimiento;
- 50

- f. ajustar la dosis media de la hormona del crecimiento prescrita en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso/día (“dosis”); y
- g. calcular la SDS predicha del IGF-I después de un mes de tratamiento con la hormona del crecimiento con la fórmula  $\text{IGF-I\_SDS\_1M} = \text{constante} + (a \times \text{IGF-I\_SDS\_B}) - (e \times \text{triglicéridos}) - (f \times \text{birth\_wt SDS}) + (b \times \text{bl\_wt SDS}) - (d \times \text{HORM-REPL}) + (c \times \text{dosis})$ , donde  $a, b, c, d, e$  y  $f$  son coeficientes positivos.

- 5 La presente invención se refiere a un método para predecir el nivel de respuesta al tratamiento con la hormona del crecimiento en un individuo que padezca el síndrome de Turner (TS), comprendiendo dicho método las etapas de:
- a. identificar que el individuo tiene:
    - el alelo C en la proteína adaptadora 2 de SH2B (SH2B2)\_rs2906713; o
    - el genotipo AA en la subunidad catalítica de 110 kD de fosfatidilinositol-3'-quinasa (PIK3CB)\_rs10513055; o
    - 10 - el alelo A en la quinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4)\_rs2069502; o
    - el alelo G en CDK4\_rs2270777; o
    - el genotipo GG en la proteína 2 del linfoma de linfocitos B (BCL2)\_rs4456611 o el alelo C en SH2B2\_rs2906713; o
    - el alelo A en BCL2\_rs4456611 y el genotipo AA en PIK3CB\_rs10513055; o
    - 15 - el alelo A en BCL2\_rs4456611 y el alelo A en CDK4\_rs2069502; o
    - el cariotipo 45X;
  - b. identificar la puntuación de la desviación estándar (SDS) del factor de crecimiento insulinoide I (IGF-I) en el punto de partida del tratamiento (“IGF-I\_SDS\_B”);
  - c. medir la concentración de triglicéridos en ayunas en el punto de partida en  $\text{mmol/L}$  (“triglicéridos”);
  - 20 d. aportar la SDS del peso al nacer (“birth\_wt SDS”);
  - e. medir la SDS del peso en el punto de partida del tratamiento (“bl\_wt SDS”);
  - f. identificar la presencia o ausencia de terapia tiroidea (“HORM-REPL”), en donde HORM-REPL es 1 si la terapia tiroidea está planificada en el individuo durante el tratamiento con la hormona del crecimiento y en donde “HORM-REPL” es 0 si la terapia tiroidea no está planificada durante la terapia con la hormona del crecimiento;
  - 25 g. ajustar la dosis media de la hormona del crecimiento prescrita en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso/día (“dosis”); y
  - h. calcular la SDS predicha del IGF-I después de un mes de tratamiento con la hormona del crecimiento con la fórmula  $\text{IGF-I\_SDS\_1M} = 0,0995 + (0,4371 \times \text{IGF-I\_SDS\_B}) - (0,3007 \times \text{triglicéridos}) - (0,0695 \times \text{birth\_wt SDS}) + (0,3661 \times \text{bl\_wt SDS}) - (0,6797 \times \text{HORM-REPL}) + (0,308 \times \text{dosis})$ ,
  - 30 en donde de acuerdo con el nivel de respuesta, el paciente se puede tratar con la hormona del crecimiento de acuerdo con un plan de cumplimiento y tratamiento optimizado, siempre que todas las etapas de identificación y medición se realicen *in vitro*.

Este método se refiere a la predicción del nivel de respuesta después de 1 mes de tratamiento con la hormona del crecimiento. El método se refiere a la predicción de la SDS del IGF-I después de un mes de tratamiento con la hormona del crecimiento.

El método de acuerdo con la invención no incluye ninguna etapa invasiva en el cuerpo del individuo.

El método de predicción no tiene en cuenta ningún marcador genético que represente el 47% de la variabilidad ( $R^2$  ajustada) en la SDS del IGF-I en 1 mes; excluyendo tres valores atípicos se obtuvo una  $R^2$  ajustada del 53%.

#### Marcadores genómicos

40 En pacientes con el alelo C en SH2B\_rs2906713, el método de predicción representa el 56% de la variabilidad en la SDS del IGF-I en 1 mes.

En pacientes con el genotipo AA en PIK3CB\_rs10513055, el método de predicción representa el 57% de la variabilidad en la SDS del IGF-I en 1 mes.

45 En pacientes con el alelo A en CDK4\_rs2069502, el método de predicción representa el 57% de la variabilidad en la SDS del IGF-I en 1 mes.

En pacientes con el alelo G en CDK4\_rs2270777, el método de predicción representa el 56% de la variabilidad en la SDS del IGF-I en 1 mes.

En pacientes con el genotipo GG en BCL2\_rs4456611 o el alelo C en SH2B\_rs2906713, el método de predicción representa el 59% de la variabilidad en la SDS del IGF-I en 1 mes.

50 En pacientes con el alelo A en BCL2\_rs4456611 y el genotipo AA en PIK3CB\_rs10513055, el método de predicción representa el 56% de la variabilidad en la SDS del IGF-I en 1 mes.

En pacientes con el alelo A en BCL2\_rs4456611 y el alelo A en CDK4\_rs2069502, el método de predicción representa el 57% de la variabilidad en la SDS del IGF-I en 1 mes.

#### Cariotipo

En pacientes con la presencia del cariotipo 45X, el método de predicción representa el 61% de la variabilidad en la SDS del IGF-I en 1 mes.

### IGFBP3 en el TS

- 5 Los resultados del estudio también muestran que para la población con TS se puede predecir el nivel de IGFBP3 después de un mes de tratamiento con la hormona del crecimiento basándose en la SDS de la IGFBP3 en el punto de partida del tratamiento, la concentración de triglicéridos en ayunas en el punto de partida en mmol/L, la concentración de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) en el punto de partida en mUI/L, la edad en el punto de partida en años, la SDS del peso en el punto de partida del tratamiento y la dosis media prescrita de la hormona del crecimiento en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso/día.
- 10 El nivel de respuesta después de un mes de tratamiento con la hormona del crecimiento se expresa en esta realización como la puntuación de la desviación estándar (SDS) predicha de la IGFBP3 después de un mes. La SDS de la IGFBP3 es un marcador de eficacia para la respuesta de crecimiento.
- La abreviatura de la SDS de la IGFBP3 después de un mes de tratamiento con la hormona del crecimiento usada en la presente memoria es IGFBP3\_SDS\_1M.
- 15 La abreviatura del punto de partida de la SDS de la IGFBP3 usada en la presente memoria es IGFBP3\_SDS\_B y se define además en la Tabla 1.
- La concentración de triglicéridos en ayunas en el punto de partida en mmol/L se abrevia en la presente memoria como triglicéridos. Los niveles de triglicéridos en ayunas se miden después de unas cuantas horas en ayunas, generalmente después de 4-12 horas en ayunas, preferiblemente después de 8-12 horas en ayunas.
- 20 La abreviatura de la concentración de TSH en el punto de partida en mUI/L es TSH\_B.
- La edad en años se abrevia en la presente memoria como edad, como se ha descrito anteriormente.
- La abreviatura de la SDS del peso en el punto de partida del tratamiento usada en la presente memoria es bl\_wt SDS, como se ha descrito anteriormente.
- 25 La dosis media prescrita de la hormona del crecimiento en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso/día se abrevia en la presente memoria como dosis, como se ha descrito anteriormente.
- Un método para predecir el nivel de respuesta al tratamiento con la hormona del crecimiento en un individuo que tiene el síndrome de Turner (TS) puede comprender las etapas de:
- 30 identificar la SDS de la IGFBP3 en el punto de partida ("IGFBP3\_SDS\_B");
  - medir la concentración de triglicéridos en ayunas en el punto de partida en mmol/L ("triglicéridos");
  - medir la concentración de TSH en el punto de partida en mUI/L ("TSH\_B");
  - aportar la edad en años en el punto de partida ("edad");
  - aportar la SDS del peso en el punto de partida del tratamiento ("bl\_wt SDS");
  - ajustar la dosis media prescrita de la hormona del crecimiento en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso/día ("dosis");
  - 35 calcular la SDS de la IGFBP3 después de un mes de tratamiento con la hormona del crecimiento con la fórmula  $\text{IGFBP3\_SDS\_B } 1\text{M} = \text{constante} + (a \times \text{IGFBP3\_SDS\_B}) - (d \times \text{triglicéridos}) + (e \times \text{TSH\_B}) - (b \times \text{edad}) + (c \times \text{bl\_wt SDS}) + (f \times \text{dosis})$ , en donde *a*, *b*, *c*, *d*, *e* y *f* son coeficientes positivos.
- En una realización preferida, la presente invención se refiere a un método para predecir el nivel de respuesta al tratamiento con la hormona del crecimiento en un individuo que tiene el síndrome de Turner (TS), comprendiendo el método las etapas de:
- 40 identificar que el individuo tiene:
    - el alelo C en la proteína adaptadora 2 de SH2B (SH2B2)\_rs2906713; o
    - el genotipo AA en la subunidad catalítica de 110 kD de fosfatidilinositol-3'-quinasa (PIK3CB)\_rs10513055; o
    - el genotipo GG en la proteína 2 del linfoma de linfocitos B (BCL2)\_rs4456611 o el alelo C en SH2B2\_rs2906713; o
    - 45 - el alelo A en BCL2\_rs4456611 y el genotipo AA en PIK3CB\_rs10513055; o
    - el alelo A en BCL2\_rs4456611 y el alelo A en la quinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4)\_rs2069502; o
    - el cariotipo 45X; o
    - un isocromosoma de brazo largo de un cromosoma X (cariotipo i(Xq));
  - 50 b. identificar la puntuación de la desviación estándar (SDS) de la proteína 3 de unión al factor de crecimiento insulinoide (IGFBP3) en el punto de partida ("IGFBP3\_SDS\_B");
  - c. medir la concentración de triglicéridos en ayunas en el punto de partida en mmol/L ("triglicéridos");
  - d. medir la concentración de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) en el punto de partida en mUI/L ("TSH\_B");
  - 55 e. aportar la edad en el punto de partida en años ("edad");
  - f. aportar la SDS del peso en el punto de partida del tratamiento ("bl\_wt SDS");
  - g. ajustar la dosis media prescrita de la hormona del crecimiento en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso/día ("dosis"); y

h. calcular la SDS predicha de la IGFBP3 después de un mes de tratamiento con la hormona del crecimiento con la fórmula  $IGFBP3\_SDS\_1M = 1,176 + (0,4658 \times IGFBP3\_SDS\_B) - (0,182 \times \text{triglicéridos}) + (0,0215 \times TSH\_B) - (0,0497 \times \text{edad}) + (0,0897 \times bl\_wt\ SDS) + (0,0032 \times \text{dosis})$ ,

5 en donde de acuerdo con el nivel de respuesta se puede tratar al paciente con la hormona del crecimiento de acuerdo con un plan de cumplimiento y tratamiento optimizado, siempre que todas las etapas de identificación y medición se realicen *in vitro*.

Este método se refiere a la predicción del nivel de respuesta después de 1 mes de tratamiento con la hormona del crecimiento. El método se refiere a la predicción de la SDS de la IGFBP3 después de un mes de tratamiento con la hormona del crecimiento.

10 El método de acuerdo con la invención no incluye ninguna etapa invasiva en el cuerpo del individuo.

El método de predicción no tiene en cuenta ningún marcador genético que represente el 53% de la variabilidad ( $R^2$  ajustada) en la SDS de la IGFBP3 en 1 mes; excluyendo dos valores atípicos aumentó la  $R^2$  hasta el 56%.

### Marcadores genómicos

15 En pacientes con el alelo C en SH2B2\_rs2906713, el método de predicción representa el 66% de la variabilidad de la SDS de la IGFBP3 en 1 mes.

En pacientes con el genotipo AA en PIK3CB\_rs10513055, el método de predicción representa el 60% de la variabilidad en la SDS de la IGFBP3 en 1 mes.

En pacientes con el genotipo GG en BCL2\_rs4456611 o el alelo C en SH2B2\_rs2906713, el método de predicción representa el 64% de la variabilidad en la SDS de la IGFBP3 en 1 mes.

20 En pacientes con el alelo A en BCL2\_rs4456611 y el genotipo A en PIK3CB\_rs10513055, el método de predicción representa el 60% de la variabilidad en la SDS de la IGFBP3 en 1 mes.

En pacientes con el alelo A en BCL2\_rs4456611 y el alelo A en CDK4-rs2069502, el método de predicción representa el 64% de la variabilidad en la SDS de la IGFBP3 en 1 mes.

### Cariotipos

25 En pacientes sin el cariotipo 45X, el método de predicción representa el 58% de la variabilidad en la SDS de la IGFBP3 en 1 mes. El cariotipo 45X significa la presencia de 45 cromosomas en cada célula en lugar de 46. El cromosoma que falta es un cromosoma X.

30 En pacientes sin la presencia del cariotipo i(Xq) el método de predicción representa el 59% de la variabilidad en la SDS de la IGFBP3 en 1 mes. El cariotipo i(Xq) define la presencia de un isocromosoma del brazo largo de un cromosoma X.

35 Los resultados de acuerdo con esta invención se pueden aplicar a métodos de medicina personalizada. La medicina personalizada es, de acuerdo con la presente solicitud de patente, el uso de información y datos de los marcadores biológicos y del genotipo de un paciente para estratificar la enfermedad, seleccionar una medicación, proporcionar una terapia o iniciar una medida preventiva que sea particularmente adecuada a ese paciente y al momento de administración. Se cree que la medicina personalizada hará posible en el futuro administrar el fármaco apropiado, en la dosis apropiada, al paciente apropiado y en el momento apropiado.

40 A los pacientes con un genotipo predictor de una respuesta buena se les puede administrar la dosis estándar de la GH, es decir, la dosis usada generalmente en la práctica clínica, que para los niños es una dosis diaria que varía desde aproximadamente 0,02 mg/kg de peso hasta aproximadamente 0,07 mg/kg de peso. Alternativamente a estos pacientes se les puede administrar una dosis optimizada.

45 Los pacientes con marcadores predictores de una respuesta mala se pueden tratar con la hormona del crecimiento de acuerdo con un plan de cumplimiento y terapia optimizado. Por tanto, se puede mejorar el cumplimiento y/o se puede optimizar la dosis de la hormona del crecimiento (GH). Se ha demostrado que una dosis optimizada de la GH que ha ser administrada a un paciente de respuesta mala puede ser una mayor dosis de GH en comparación con la dosis estándar, como una relación de respuesta a la dosis en términos de velocidad del crecimiento en los primeros 2 años de tratamiento; y esto en un intervalo de dosis compatible con la dosis fijada usada para tratar pacientes con GHD o TS en los ajustes actuales. Los respondedores malos pueden ser candidatos también para terapias con análogos de la GH de acción prolongada con una frecuencia de administración que sea menor.

50 Se describe un método en el que se trata con la hormona del crecimiento un individuo identificado como de respuesta mala o de respuesta buena de acuerdo con un plan de cumplimiento y terapia optimizado. Un método para tratar la deficiencia de la hormona del crecimiento (GHD) o el síndrome de Turner (TS) en un individuo que lo necesite comprende las etapas de:

- a. identificar el nivel de respuesta al tratamiento con la hormona del crecimiento de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente,
- b. tratar al individuo de acuerdo con el plan de cumplimiento y terapia optimizado.

5 En una situación, el individuo se identifica como de respuesta mala y se trata con una dosis de la hormona del crecimiento que está optimizada en comparación con la dosis estándar. En una situación, un individuo de respuesta mala se trata con una dosis de la hormona del crecimiento que es mayor en comparación con la dosis estándar.

10 Además, se describe el uso de la hormona del crecimiento en la preparación de un medicamento para tratar la deficiencia de la hormona del crecimiento (GHD) o el síndrome de Turner (TS) en un individuo que lo necesite, en donde el individuo ha sido identificado de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente como de respuesta mala o de respuesta buena al tratamiento con la hormona del crecimiento.

Se describe la hormona del crecimiento para uso en el tratamiento de la deficiencia de la hormona del crecimiento (GHD) o el síndrome de Turner (TS) en un individuo que lo necesite, en donde el individuo ha sido identificado de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente como de respuesta mala o de respuesta buena al tratamiento con la hormona del crecimiento.

15 La hormona del crecimiento es preferiblemente la hormona del crecimiento humana y más preferiblemente la hormona del crecimiento humana recombinante. Las realizaciones particulares de la invención se refieren a la hormona del crecimiento como la vendida con la marca registrada SAIZEN®.

20 Las formulaciones útiles en un método para tratar un paciente con GHD o TS pueden ser formulaciones farmacéuticas líquidas o formulaciones liofilizadas reconstituidas que comprenden la hormona del crecimiento. Preferiblemente, las formulaciones se estabilizan con un poliol, más preferiblemente un disacárido e incluso más preferiblemente sacarosa.

A continuación, la presente invención se ilustrará por medio de los siguientes ejemplos que no han de ser interpretados como limitativos del alcance de la invención.

## Ejemplos

### 25 Ejemplo 1: Métodos

#### *Diseño del estudio*

30 PREDICT (NCT00256126) era un estudio multicentro prospectivo, abierto en fase IV en el tratamiento de niños pre-puberales sin tratamiento previo con la GH. El principal objetivo del estudio PREDICT fue investigar cuales eran los biomarcadores séricos más sensibles después de un mes de tratamiento con la GH recombinante humana (r-hGH) de niños con GHD o TS.

#### *Pacientes*

35 Para ser elegibles para este estudio, los niños tenían que haber sido diagnosticados de GHD o TS y haber sido candidatos para terapia con r-hGH. Para la GHD el diagnóstico se confirmó usando dos ensayos diferentes de estimulación con la GH (sin sensibilización); ambos ensayos requerían una concentración máxima de GH  $\leq 10$  mcg/L frente al patrón de referencia internacional de la GH. Para el TS el diagnóstico se confirmó por análisis del cariotipo. Se requería la presencia de la línea celular 45 X/46 X o 45 X o una línea celular con deleción del brazo corto del cromosoma X (deleción SHOX o Xp). Los niños con las deleciones SHOX se clasificaron como pacientes con TS si la deleción estaba próxima a la unión entre Xp22.2 y Xp22.3.

40 Se excluyeron pacientes si tenían GHD debida a un tumor en el sistema nervioso central, traumatismo, infección, radiación previa o cirugía del cráneo; o si habían recibido un tratamiento previo con GH, hormona liberadora de GH, esteroides anabólicos o glucocorticoides (excepto sustitución hormonal si tanto el estado como el régimen permanecían estables durante al menos 3 meses). También se excluyeron los pacientes con cualquier patología grave asociada que afectara al crecimiento, diabetes mellitus de tipo I o II o hipertensión intracraneal idiopática. No fueron elegibles para este estudio pacientes con enfermedades simultáneas significativas, enfermedad hepática o renal crónica o infecciosa, enfermedad maligna o enfermedad autoinmunitaria (excepto tiroiditis autoinmunitaria crónica con niveles normales de hormonas de la tiroides).

45 Todos los niños no debían haber tenido un tratamiento previo con la GH ni un estado pre-puberal definido por la fase 1 de Tanner. Se requería una función normal de la tiroides o una terapia de sustitución adecuada durante al menos 3 meses, así como peso y estatura dentro de los intervalos normales específicos de la población para el sexo (percentiles  $>5^{\circ}$  y  $<95^{\circ}$ ).

50 Los pacientes se reclutaron en clínicas de endocrinología pediátrica. Antes de que un niño pudiera participar en el estudio, sus padres o tutores tenían que facilitar el consentimiento informado por escrito. Si el niño fuera suficientemente mayor para poder leer y escribir se le ofrecería para la firma un impreso de consentimiento separado. El pro-

ceso de consentimiento informado estaba de acuerdo con las buenas prácticas clínicas, los requisitos reguladores nacionales y los principios de las directrices de la Declaración de Helsinki.

#### Tratamiento

5 Se administró diariamente por vía subcutánea (sc) a la hora de acostarse solución de r-hGH (Saizen®, Merck Serono S.A. - Ginebra, Suiza) (8 mg/24 UI, que contenía 0,3% de metacresol) usando un dispositivo auto-inyector (one click®, Merck Serono S. A. - Ginebra) durante 1 mes. Los niños con GHD y TS recibieron la dosis (sc) una vez al día registrada como dosis de r-hGH (0,035 y 0,050 mg/kg de peso/día, respectivamente).

#### Resultados

10 El punto final principal fue un cambio en el mismo paciente de la puntuación de la desviación estándar (SDS) del IGF-I en suero después de 1 mes de terapia con r-hGH mayor que 0,31 SD en niños con GHD o TS. El requisito de un cambio mayor del 15% estaba basado tanto en la variabilidad intra-ensayos como inter-ensayos para IGF-I. Los puntos finales secundarios incluían cambios en otros biomarcadores dependientes de la GH: IGFBP3, glucosa en ayunas, insulina en ayunas, índice de resistencia a la insulina, (evaluación en el modelo de homeostasis de la resistencia a la insulina, ensayo HOMA-IR), colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicéridos y bAP después de 1 mes de tratamiento. Además se determinó la T<sub>4</sub> libre y la hormona estimulante de la tiroides (TSH). Se determinó la seguridad describiendo los episodios adversos (AE), hematología y parámetros bioquímicos habituales, cambios desde el punto de partida de los parámetros del metabolismo de la glucosa, niveles de lípidos y análisis de la función de la tiroides. Los análisis subsiguientes incluían la correlación entre el cambio porcentual en los niveles de biomarcadores y la SDS de IGF-I, la SDS de IGFBP3 o HOMA-IR.

20 En la inspección en el punto de partida se recogieron datos demográficos (sexo, edad, edad gestacional al nacer, duración del nacimiento y peso, altura parental) e historial médico. Se midieron el peso y la altura y se calculó el índice de masa corporal (BMI). Se realizaron tomas de muestras de sangre para análisis central de biomarcadores séricos en el punto de partida y después de 1 mes de tratamiento. Se analizaron el IGF-I y la IGFBP3 usando el dispositivo de análisis de inmunoensayo Immulite 2000 (Siemens Healthcare Diagnostics, Alemania).

#### 25 Análisis estadístico

El tamaño de la muestra se basó en el nivel de cambio de la SDS del IGF-I después de 1 mes de tratamiento de pacientes con TS, como se indicó en un estudio previo (Van Teunenbroek A. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81:4013-4021). Se requirió un tamaño de muestra de 163 pacientes para proporcionar una potencia del 90% para analizar el nivel de significancia de un lado de 0,025 para un aumento del 15% en los niveles de IGF-I desde el punto de partida hasta 1 mes, como se define por los niveles medios (SD) en el punto de partida de 89,0 (37,2) µg/L (Van Teunenbroek A. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81:4013-4021, 1996). Para tener en cuenta una tasa de abandono del 10%, era necesario reclutar 360 pacientes para asegurar para el análisis 326 pacientes evaluables con la GHD o el TS.

35 Los niveles de altura, peso, BMI, IGF-I e IGFBP3 se convirtieron en la SDS usando los datos de referencia pertinentes. La SDS para IGF-I e IGFBP3 se calcularon teniendo en cuenta los niveles medios y la variabilidad para la edad y el sexo basándose en los datos de referencia de una población de niños sanos (Elmmlinger MW et al., *Clin. Chem. Lab. Med.* 42:654-664; 2004). Esto proporciona los contornos de las distribuciones normales ajustados a la frecuencia de los niveles séricos transformados en sus logaritmos, para el valor 0 de la SD (es decir, la media),  $\pm 1$  SD y  $\pm 2$  SD. Cuando no había disponibles datos de referencia, el cambio de la concentración se normalizó con respecto al punto de partida y se expresó como porcentaje.

Debido a que los datos no estaban distribuidos normalmente se usó el ensayo de rango con signos de Wilcoxon para evaluar cambios dentro de los dos grupos y se usó el ensayo de suma de rangos de Wilcoxon para evaluar cambios entre los dos grupos. Se usó el coeficiente de Spearman para medir la correlación entre el cambio porcentual en los niveles de biomarcadores y la SDS de IGF-I, la SDS de IGFBP3 o HOMA-IR.

#### 45 Desarrollo del modelo de predicción

Se usó regresión lineal multivariante para encontrar el mejor modelo de ajuste que predijera la SDS de IGF-I en 1 mes para la GHD y la SDS de IGF-I y la SDS de IGFBP3 en 1 mes para el TS. Se usó el programa informático SAS® para realizar el análisis estadístico.

50 Los factores predictores potenciales incluían nacimiento, auxología, tratamiento y características parentales y biomarcadores en el punto de partida (véase la Tabla 1).

El procedimiento escalonado se usó con los requisitos relajados ( $\alpha = 0,15$ ) para identificar los predictores más potentes (hasta 10).

Los criterios de información de Akaike (AIC), una herramienta para una selección óptima del modelo, son función del número de observaciones, la suma de los errores al cuadrado y el número de predictores (Akaike H. *2nd International*

*Symposium of Information Theory 1973*. BN Petrox and Caski, eds. Akademiai Kiado, Budapest, 267-281).

Se considera el modelo con el mejor ajuste el que presenta los AIC más pequeños.

5 El término  $R^2$  es la proporción de variabilidad en el conjunto de datos que es representado por el modelo y proporciona una medición de cómo los buenos resultados futuros son predichos probablemente por el modelo. La  $R^2$  tiene en cuenta adicionalmente el número de términos explicativos. El modelo descrito incluye la dosis diaria media de la GH recibida por kg de peso ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) y los equilibrios de AIC, la  $R^2$  ajustada y el número y relevancia clínica de predictores para facilidad de uso en un ajuste clínico.

El modelo descrito se aplicó luego a análisis de subgrupos de marcadores genómicos que muestran la asociación más fuerte con el cambio de la SDS de IGF-I, para evaluar la variabilidad explicada en estas sub-poblaciones.

10 **Tabla 1. Factores predictores potenciales en consideración**

Factor predictor potencial	Descripción
<b>Características al nacer</b>	
Edad gestacional (semanas)	
Sexo (para la GHD)	
SDS de la altura al nacer	En estadística, una puntuación de la desviación estándar (SDS) es una cantidad adimensional obtenida restando la media de población de una puntuación en bruto individual y dividiendo luego la diferencia por la desviación estándar de la población. Este proceso de conversión se denomina estandarización o normalización. Para cada sujeto ha sido calculada una puntuación de la desviación estándar (SDS) para la altura al nacer (cm). Los datos de referencia usados para calcular los valores de la SDS de la altura al nacer han sido publicados por Usher et al., ( <i>J. Pediatr.</i> 74, 901-910;1969).
SDS del peso al nacer	En estadística, una puntuación de la desviación estándar (SDS) es una cantidad adimensional obtenida restando la media de población de una puntuación en bruto individual y dividiendo luego la diferencia por la desviación estándar de la población. Este proceso de conversión se denomina estandarización o normalización. Para cada sujeto ha sido calculada una puntuación de la desviación estándar (SDS) para el peso al nacer (kg). Los datos de referencia usados para calcular los valores de la SDS del peso al nacer han sido publicados por Usher et al., ( <i>J. Pediatr.</i> 74, 901-910;1969).
SGA al nacer (pequeño para su edad gestacional)	SDS de la altura al nacer $\leq -2$ y/o SDS del peso al nacer $\leq -2$ (Clayton et al., <i>J. Clin. Endocrinol. Metabol.</i> 92:804-810; 2007)
<b>Características auxológicas</b>	
Edad en el punto de partida (años)	Edad cronológica = {Fecha de la evaluación en el punto de partida} - {Fecha de nacimiento}/365,25 La edad se expresa con un punto decimal
SDS del BMI en el punto de partida	En estadística, una puntuación de la desviación estándar (SDS) es una cantidad adimensional obtenida restando la media de población de una puntuación en bruto individual y dividiendo luego la diferencia por la desviación estándar de la población. Este proceso de conversión se denomina estandarización o normalización. Para cada sujeto ha sido calculada una puntuación de la desviación estándar (SDS) para el BMI en el punto de partida ( $\text{Kg}/\text{m}^2$ ). Los datos de referencia usados para calcular los valores de la SDS en el punto de partida del BMI han sido publicados por Rolland-Cachera et al., ( <i>Eur. J. Clin. Nutr.</i> 1991 Jan; 45(1):13-21).

SDS de la altura en el punto de partida	En estadística, una puntuación de la desviación estándar (SDS) es una cantidad adimensional obtenida restando la media de población de una puntuación en bruto individual y dividiendo luego la diferencia por la desviación estándar de la población. Este proceso de conversión se denomina estandarización o normalización. Para cada sujeto ha sido calculada una puntuación de la desviación estándar (SDS) para la altura en el punto de partida (m). Los datos de referencia usados para calcular los valores de la SDS de la altura en el punto de partida han sido publicados por Sempé et al., ( <i>Auxologie, methods et sequences</i> , París: Theraplix, 1979).
SDS del peso en el punto de partida	En estadística, una puntuación de la desviación estándar (SDS) es una cantidad adimensional obtenida restando la media de población de una puntuación en bruto individual y dividiendo luego la diferencia por la desviación estándar de la población. Este proceso de conversión se denomina estandarización o normalización. Para cada sujeto ha sido calculada una puntuación de la desviación estándar (SDS) para el peso en el punto de partida (kg). Los datos de referencia usados para calcular los valores de la SDS del peso en el punto de partida han sido publicados por Sempé et al., ( <i>Auxologie, methods et sequences</i> , París: Theraplix, 1979).
Edad de los huesos (años)	Se requiere un análisis por rayos X de la muñeca izquierda para establecer la edad de los huesos en el punto de partida, si no se realizó en los 6 últimos meses. El investigador realiza la evaluación de acuerdo con el método de Greulich y Pyle, y el valor se expresa en años.
Retraso de la edad de los huesos (años)	Edad cronológica (años) - Edad de los huesos (años)
SDS de la altura parental media	Altura parental media (SDS): $\text{Altura parental media (SDS)} = (\text{Altura de la madre (SDS)} + \text{Altura del padre (SDS)})/1,61$ (Ranke, <i>Horm. Res.</i> 45:64-66; 1996)  donde $\text{Altura de la madre (SDS)} = (\text{Altura de la madre (cm)} - 163,3)/5,6$ $\text{Altura del padre (SDS)} = (\text{Altura del padre (cm)} - 175,0)/6,0.$ ( <i>Adult reference data</i> , Sempé et al., 1979)
Distancia a la SDS de la altura objetivo	SDS de la altura en el punto de partida – SDS de la altura parental media
<b>Tratamiento con la GH</b>	
Dosis de GH (µg/kg/día)	La dosis se transformó de mg/kg/día en µg/kg/día
Cumplimiento (%)	Cada cumplimiento del tratamiento del estudio del paciente se estima como porcentaje de su número objetivo de días en el que los pacientes deben haber recibido una o más inyecciones de la hormona del crecimiento mientras está en curso el estudio (% de cumplimiento = 100 x número de días que recibieron inyecciones de la hormona del crecimiento/número de días en el estudio)
<b>Otro tratamiento</b>	
Terapia de sustitución tiroidea	Descrita como medicaciones simultáneas durante el estudio
<b>Gravedad de la deficiencia de la GH</b>	
Máximo de la GH (µg/L) (para la GHD)	Diagnóstico de la GHD pre-establecido documentado con una respuesta máxima a la GH <10 µg/L con 2 ensayos de estimulación con la GH, sin cebado con estradiol
<b>Biomarcadores en el punto de partida</b>	



SDS del IGF-I	La concentración absoluta de IGF-I se convirtió en una puntuación de la desviación estándar (SDS) (véase referencia más adelante). En estadística, una puntuación de la desviación estándar (SDS) es una cantidad adimensional obtenida restando la media de población de una puntuación en bruto individual y dividiendo luego la diferencia por la desviación estándar de la población. Este proceso de conversión se denomina estandarización o normalización. Para cada sujeto y en cada momento de tiempo han sido calculadas las puntuaciones de la desviación estándar (SDS) para IGF-I. Los datos de referencia usados para calcular los valores de la SDS han sido publicados por Elmlinger et al., ( <i>Clin. Chem. Lab. Med.</i> 42(6):654-664; 2004).
SDS de la IGFBP3	La concentración absoluta de IGFBP3 se convirtió en una puntuación de la desviación estándar (SDS) (véase referencia más adelante). En estadística, una puntuación de la desviación estándar (SDS) es una cantidad adimensional obtenida restando la media de población de una puntuación en bruto individual y dividiendo luego la diferencia por la desviación estándar de la población. Este proceso de conversión se denomina estandarización o normalización. Para cada sujeto y en cada momento de tiempo han sido calculadas las puntuaciones de la desviación estándar (SDS) para IGFBP3. Los datos de referencia usados para calcular los valores de la SDS han sido publicados por Elmlinger et al., ( <i>Clin. Chem. Lab. Med.</i> 42(6):654-664; 2004).
HOMA-IR	Comunicado por el laboratorio central
Glucosa (mmol/L)	Comunicado por el laboratorio central
Insulina (pmol/L)	Comunicado por el laboratorio central
Colesterol total (mmol/L)	Comunicado por el laboratorio central
Colesterol LDL (mmol/L)	Comunicado por el laboratorio central
Colesterol HDL (mmol/L)	Comunicado por el laboratorio central
Triglicéridos (mmol/L)	Comunicado por el laboratorio central
Fosfatasa alcalina ósea (U/L)	Comunicado por el laboratorio central
T4 libre (pmol/L)	Comunicado por el laboratorio central
TSH (mUI/L)	Comunicado por el laboratorio central

Significado de las abreviaturas: BMI = índice de masa corporal [por la expresión inglesa *Body Mass Index*]; HDL = lipoproteína de alta densidad [por la expresión inglesa *High-Density Lipoprotein*]; HOMA-IR = evaluación del modelo de homeostasis de resistencia a la insulina [por la expresión inglesa *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*]; IGF = factor de crecimiento insulinoide [por la expresión inglesa *Insulin-like growth factor*]; IGFBP3 = proteína 3 de unión al IGF [por la expresión inglesa *IGF Binding Protein 3*]; LDL = lipoproteína de baja densidad [por la expresión inglesa *Low-Density Lipoprotein*]; SDS = puntuación de la desviación estándar [por la expresión inglesa *Standard Deviation Score*]; SGA = pequeño para su edad gestacional [por la expresión inglesa *Small for Gestational Age*]; T4 = Tiroxina; TSH = hormona estimulante de la tiroides [por la expresión inglesa *Thyroid Stimulating Hormone*].

#### Datos demográficos,

El estudio se llevó a cabo entre mayo de 2005 y septiembre de 2007 en 42 centros de 15 países. Dichos países incluyeron varios europeos, así como Argentina, Australia, Canadá, Corea, Rusia y Taiwan. En total, 52,9% de la población del estudio fue reclutada en tres países: Rusia 23,0% (73/318), España 15,4% (49/318) y Francia 14,5% (46/318). En total, fueron 319 niños los que aceptaron participar en el estudio, pero antes de recibir el tratamiento se retiró un paciente con GHD. Por tanto, en el estudio se reclutaron 318 niños y recibieron al menos una dosis de r-hGH (la intención de tratar la población): de estos, 169 tenían GHD y 149 tenían TS. En el grupo con GHD, 63 fueron hembras. En total, 314 (98,7%) de los niños completaron el estudio. Cuatro niños se retiraron del estudio prematuramente; siendo las razones de la retirada defectos del auto-inyector (n = 1), vómitos (n = 1), anulación del consentimiento (n = 1) y pérdida del seguimiento (n = 1). En 11,3% (36/318) de los pacientes se produjeron una o más desviaciones del protocolo (GHD, n = 27; TS, n = 9). Las desviaciones del protocolo más comunes fueron el peso para la estatura fuera del intervalo del protocolo (16/319), < 80% del tratamiento programado administrado (10/319) y menos de 4/7 días de dosificación en la última semana del tratamiento/semana de toma de muestras (5/319). El cumplimiento del tratamiento fue generalmente alto (95%) y fue similar en ambos grupos. Hubo algunas similitudes

interesantes entre los grupos en edad gestacional al nacer, duración del parto, edad, altura y velocidad de crecimiento. Sin embargo, los dos grupos difirieron ligeramente en el punto de partida: el grupo con GHD tenía un menor valor de la mediana del BMI, mayor peso al nacer, padres más bajos, menor edad de los huesos, menores IGF-I y IGFBP3, mayores valores de colesterol, colesterol LDL y bAP, y menores T4 y TSH que el grupo con TS. En el grupo co GHD, el IGF-I pero no la IGFBP3 estaba influenciado por la GH máxima.

De los niños con TS, el 46,3% (69/149) tenía monosomía X (45, X) coherente con las normas conocidas de la población con TS (Sybert VP et al., *N. England J. Med.* 351:1227-1238). El resto tenía una delección parcial (46, del[X]), un isocromosoma del brazo largo de un cromosoma X (46, X i[Xq]) o mosaicismo para 45 X con uno o más linajes celulares.

## 10 Seguridad

El perfil de seguridad de Saizen® en este estudio era congruente con la experiencia previa con la terapia con la GH. Se describió en un niño con GHD un grave episodio adverso de tonsilitis estreptocócica pero se consideró que era improbable que estuviera relacionado con el tratamiento. Hubo unos cuantos cambios poco significativos observados en los parámetros hematológicos, en los análisis de la función de la tiroides o signos vitales durante el curso del periodo de tratamiento.

### *Biomarcadores en el punto de partida*

Como era de esperar se observaron valores de IGF-I e IGFBP3 significativamente inferiores (tanto de la SDS como absolutos) en el grupo con GHD en comparación con el grupo con TS. Los niños con TS tenían niveles de triglicéridos significativamente superiores en comparación con el grupo con GHD, pero los niveles de colesterol total y de colesterol LDL eran significativamente inferiores. Los niveles de colesterol HDL no diferían significativamente entre los dos grupos. No hubo diferencias significativas en los biomarcadores del metabolismo de la glucosa (nivel de insulina, nivel de glucosa e índice de resistencia a la insulina) entre los dos grupos. Aunque la SDS del BMI fue significativamente superior en el grupo con TS, el grado de sensibilidad a la insulina no difería significativamente en el punto de partida entre los grupos. Cuando los niños con GHD fueron clasificados por categorías por la gravedad de la GHD basada en el nivel máximo de la GH alcanzado durante el ensayo de estimulación, la mayoría (92%, 156/169) tenía niveles de GH  $\leq 7,0$   $\mu\text{g/L}$  (79 tenían  $<4$ , 77 tenían  $> 4-7$  y 13 tenían  $7-10$   $\mu\text{g/L}$ ).

### *Cambios de biomarcadores después de 1 mes de tratamiento*

El punto final de la eficacia primaria se cumplió con un incremento  $\geq 0,31$  en la SDS del IGF-I desde el punto de partida hasta 1 mes en 92% de los niños con GHD o TS. Después de 1 mes de tratamiento, hubo cambios estadísticamente significativos desde el punto de partida en los niveles de todos los biomarcadores medidos en niños con GHD o TS con la excepción del índice aterogénico (colesterol LDL/colesterol HDL) tanto en niños con GHD como con TS, así como los niveles de TSH en solamente GHD. Se observó una variabilidad considerable en la magnitud del cambio en todos los biomarcadores tanto en GHD como en TS. Cuando se clasificaron por la magnitud del cambio desde el punto de partida hasta 1 mes, los niveles de IGF-I e insulina en ayunas se clasificaron primero y segundo respectivamente, tanto en GHD como en TS, seguido por la IGFBP3. Los primeros cinco biomarcadores más "sensibles" fueron los mismos en ambos grupos.

También hubo diferencias significativas en el grado de cambio en biomarcadores entre los grupos. Los niños con TS mostraron aumentos de los valores de la mediana significativamente mayores en la SDS del IGF-I y de la relación SDS de IGF-I/SDS de IGFBP3 en comparación con niños con GHD. Por el contrario los niños con GHD mostraron disminuciones del valor de la mediana significativamente mayores en el colesterol total y en el colesterol LDL, en comparación con los niños con TS. Los cambios en colesterol HDL, triglicéridos, bAP y resistencia a la insulina no difirieron significativamente entre los grupos.

Los inventores observaron una diferencia significativa en cambios del IGF-I y de la IGFBP3 después de 1 mes de tratamiento entre los tres subgrupos de deficiencia en la GH de acuerdo con el máximo de la GH en el ensayo de diagnóstico con estimulación (máximo  $<4$ ,  $>4-7$  y  $>7-10$   $\mu\text{g/mL}$ ). Entre grupos diferentes, dichos cambios fueron  $p < 0,001$  para IGF-I y  $p < 0,008$  para IGFBP3. Este hallazgo es congruente con una diferencia en la gravedad de la deficiencia de GH como es clasificada por el máximo de la GH.

### *Análisis de correlación*

La correlación entre los cambios de porcentajes desde el punto de partida en los niveles de biomarcadores con cambios en SDS del IGF-I, SDS de la IGFBP3, relación SDS de IGF-I/SDS de IGFBP3 o HOMA-IR hasta 1 mes de tratamiento con la GH se muestra en la Tabla 4. En ambos grupos, tanto los cambios en los índices de niveles de insulina como de resistencia a la insulina en HOMA estaban de manera significativa fuertemente correlacionados con cambios en la SDS del IGF-I pero no con cambios en la IGFBP3; esto es un hallazgo interesante puesto que los cambios en el IGF-I y la IGFBP3 están correlacionados entre sí. Los cambios en todos los biomarcadores lipídicos, con la excepción de los triglicéridos, mostraron una correlación estadísticamente significativa con los cambios en la IGFBP3 en el TS, pero no en el grupo con GHD. Los cambios en la relación SDS de IGF-I/SDS de IGFBP3 no estaban significativamente correlacionados con los cambios en los biomarcadores lipídicos o la insulina en ningún grupo.

*SDS del IGF-I en 1 mes para GHD*

El modelo descrito para predecir la SDS del IGF-I en 1 mes incluía los siguientes factores de predicción.

SDS del IGF-I en 1 mes =  $-$  constante + a (SDS del IGF-I en el punto de partida) + b (SDS del peso en el punto de partida) + c (cumplimiento (%)) + d (edad en el punto de partida (años)) + e (dosis de GH ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ))

Factor predictor	R <sup>2</sup> ajustada acumulativa	Coefficiente
Intersección		-4,7265
SDS del IGF-I en el punto de partida	58,90%	0,7065
+ SDS del peso en el punto de partida	62,54%	0,2446
+ Cumplimiento (%)	63,97%	0,0423
+ Edad en el punto de partida (años)	64,95%	0,057
+ Dosis de la GH ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ )	66,07%	0,0402

5 Estos factores representaron el 66% de la variabilidad (R<sup>2</sup> ajustada) en la SDS del IGF-I en 1 mes; excluyendo tres valores atípicos se obtuvo una R<sup>2</sup> ajustada del 76%.

10 El modelo descrito se aplicó luego a análisis de subgrupos de marcadores genómicos que habían demostrado estar asociados con el cambio de la SDS del IGF-I para evaluar la variabilidad explicada en estas sub-poblaciones. Los resultados son como sigue:

Población	N	R <sup>2</sup> ajustada
Todos los individuos de quienes se usaron factores biológicos, clínicos y terapéuticos para obtener el modelo predictor a largo plazo	162	66%
Genotipo AA de CDK4_rs2270777	35	81%
A alélico de LEPR_rs970467	32	71%

CDK4 = quinasa 4 dependiente de ciclina [por la expresión inglesa *Cyclin-Dependent Kinase 4*]; LEPR = receptor de leptina [por la expresión inglesa *Leptin Receptor*].

*SDS del IGF-I en 1 mes para el TS*

15 El modelo descrito para predecir la SDS del IGF-I en 1 mes incluía los siguientes factores de predicción:

SDS del IGF-I = constante + a (SDS del IGF-I en el punto de partida) + b (SDS del peso en el punto de partida) + c (dosis de la GH ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ )) - d (terapia de sustitución de la tiroides) - e (triglicéridos en el punto de partida (mmol/L)) - f (SDS del peso al nacer).

Factor predictor	R <sup>2</sup> ajustada acumulativa	Coefficiente
Intersección		0,0995
SDS del IGF-I en el punto de partida	33,28%	0,4371
+ SDS del peso en el punto de partida	42,87%	0,3661
+ Dosis de la GH ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ )	44,17%	0,3080
+ Terapia de sustitución de la tiroides	45,85%	-0,6797
+Triglicéridos en el punto de partida (mmol/L)	46,40%	-0,3007
+ SDS del peso al nacer	46,64%	-0,0695

20 Estos factores representaron el 47% de la variabilidad (R<sup>2</sup> ajustada) en la SDS del IGF-I en 1 mes; excluyendo un valor atípico se obtuvo una R<sup>2</sup> ajustada del 53%.

El modelo descrito se aplicó luego a análisis de subgrupos de marcadores genómicos que habían demostrado estar asociados con el cambio de la SDS del IGF-I para evaluar la variabilidad explicada en estas sub-poblaciones. Los resultados son como sigue:

Población	N	R <sup>2</sup> ajustada
Todos los individuos de quienes se usaron factores biológicos, clínicos y terapéuticos para obtener el modelo predictivo a largo plazo	124	47%
C alélico de SH2B2_rs2906713	34	56%
genotipo AA de PIK3CB_rs10513055	91	57%
A alélico de CDK4_rs2069502	70	57%
G alélico de CDK4_rs2270777	100	56%

genotipo GG de BCL2_rs4456611 o C alélico de SH2B2_rs2906713	49	59%
A alélico de BCL2_rs4456611 y genotipo AA de PIK3CB_rs10513055	76	56%
A alélico de BCL2_rs4456611 y A alélico de CDK4_rs2069502	55	57%
Presencia del cariotipo 45X	57	61%

CDK4 = quinasa 4 dependiente de ciclina; PIK3CB = subunidad catalítica de 110 kD de fosfatidilinositol-3'-quinasa; SH2B2 = proteína adaptadora 2 de SH2B; BCL2 = proteína 2 del linfoma de linfocitos B.

*SDS de la IGFBP3 en 1 mes para TS*

- 5 El modelo descrito para predecir la SDS de la IGFBP3 en 1 mes incluía los siguientes factores predictores:

SDS de la IGFBP3 en 1 mes = constante + a (SDS de la IGFBP3 en el punto de partida) - b (edad en el punto de partida (años)) + c (SDS del peso en el punto de partida) - d (triglicéridos en el punto de partida (mmol/L)) + e (TSH en el punto de partida (mUI/L)) + f (dosis de la GH (µg/kg/día)).

Factor predictor	R <sup>2</sup> ajustada acumulativa	Coefficiente
Intersección		1,1760
SDS de la IGFBP3 en el punto de partida	46,73%	0,4658
+ Edad en el punto de partida (años)	51,08%	0,0497
+ SDS del peso en el punto de partida	52,45%	0,0897
+ TSH en el punto de partida (mUI/L)	52,91%	0,0215
+ Triglicéridos en el punto de partida (mmol/L)	53,38%	-0,1820
+ Dosis de la GH (µg/kg/día)	53,01%	0,0032

- 10 Estos factores representaron el 53% de la variabilidad (R<sup>2</sup> ajustada) en SDS de la IGFBP3 en 1 mes; excluyendo dos valores atípicos aumentó la R<sup>2</sup> ajustada hasta 56%.

El modelo descrito se aplicó luego a análisis de subgrupos de marcadores genómicos que habían demostrado estar asociados con el cambio de la SDS de la IGFBP3 para evaluar la variabilidad explicada en estas sub-poblaciones. Los resultados son como sigue:

Población	N	R <sup>2</sup> ajustada
Todos los individuos de quienes se usaron factores biológicos, clínicos y terapéuticos para obtener el modelo predictivo a largo plazo	118	53%
C alélico de SH2B2_rs2906713	33	66%
genotipo AA de PIK3CB_rs10513055	89	60%
genotipo GG de BCL2_rs4456611 o C alélico de SH2B2_rs2906713	47	64%
A alélico de BCL2_rs4456611 y genotipo AA de PIK3CB_rs10513055	74	60%
A alélico de BCL2_rs4456611 y A alélico de CDK4_rs2069502	55	64%
Ausencia de cariotipo 45X	66	58%
Ausencia de cariotipo i(Xq)	86	59%

- 15 CDK4 = quinasa 4 dependiente de ciclina; PIK3CB = subunidad catalítica de 110 kD de fosfatidilinositol-3'-quinasa; SH2B2 = proteína adaptadora 2 de SH2B; BCL2 = proteína 2 del linfoma de linfocitos B.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir el nivel de respuesta al tratamiento con la hormona del crecimiento en un individuo que tiene deficiencia de la hormona del crecimiento (GHD), comprendiendo el método las etapas de:

- a. identificar que el individuo tiene:
  - el genotipo AA en la quinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4)\_rs2270777; o
  - el alelo A en el receptor de leptina (LEPR)\_rs970467;
- b. identificar la puntuación de la desviación estándar (SDS) del factor de crecimiento insulinoide I (IGF-I) en el punto de partida del tratamiento ("IGF-I\_SDS\_B");
- c. ajustar el cumplimiento del tratamiento en porcentaje de dosis esperada/dosis planificada durante el primer mes de tratamiento ("cumplimiento");
- d. medir la SDS del peso en el punto de partida del tratamiento ("bl\_wt SDS");
- e. ajustar la dosis media prescrita de la hormona del crecimiento en µg/kg de peso/día ("dosis");
- f. aportar la edad en años ("edad"); y
- g. calcular la SDS predicha del IGF-I después de un mes de tratamiento con la hormona del crecimiento con la fórmula  $IGF-I\_SDS\_1M = -4,7265 + (0,7065 \times IGF-I\_SDS\_B) + (0,0423 \times \text{"cumplimiento"}) + (0,2446 \times bl\_wt\ SDS) + (0,0402 \times \text{"dosis"}) + (0,057 \times \text{"edad"})$ ,

en donde el nivel predicho de respuesta se usa para optimizar un plan de cumplimiento y tratamiento, siempre que todas las etapas de identificación y medición se realicen *in vitro*.

2. Un método para predecir el nivel de respuesta al tratamiento con la hormona del crecimiento en un individuo que padezca el síndrome de Turner (TS), comprendiendo dicho método las etapas de:

- a. identificar que el individuo tiene:
  - el alelo C en la proteína adaptadora 2 de SH2B (SH2B2)\_rs2906713; o
  - el genotipo AA en la subunidad catalítica de 110 kD de fosfatidilinositol-3'-quinasa (PIK3CB)\_rs10513055; o
  - el alelo A en la quinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4)\_rs2069502; o
  - el alelo G en CDK4\_rs2270777; o
  - el genotipo GG en la proteína 2 del linfoma de linfocitos B (BCL2)\_rs4456611 o el alelo C en SH2B2\_rs2906713; o
  - el alelo A en BCL2\_rs4456611 y el genotipo AA en PIK3CB\_rs10513055; o
  - el alelo A en BCL2\_rs4456611 y el alelo A en CDK4\_rs2069502; o
  - el cariotipo 45X;
- b. identificar la puntuación de la desviación estándar (SDS) del factor de crecimiento insulinoide I (IGF-I) en el punto de partida del tratamiento ("IGF-I\_SDS\_B");
- c. medir la concentración de triglicéridos en ayunas en el punto de partida en mmol/L ("triglicéridos");
- d. aportar la SDS del peso al nacer ("birth\_wt SDS");
- e. medir la SDS del peso en el punto de partida del tratamiento ("bl\_wt SDS");
- f. identificar la presencia o ausencia de terapia tiroidea ("HORM-REPL"), en donde HORM-REPL es 1 si la terapia tiroidea está planificada en el individuo durante el tratamiento con la hormona del crecimiento y en donde "HORM-REPL" es 0 si la terapia tiroidea no está planificada durante la terapia con la hormona del crecimiento;
- g. ajustar la dosis media de la hormona del crecimiento prescrita en µg/kg de peso/día ("dosis"); y
- h. calcular la SDS predicha del IGF-I después de un mes de tratamiento con la hormona del crecimiento con la fórmula  $IGF-I\_SDS\_1M = 0,0995 + (0,4371 \times IGF-I\_SDS\_B) - (0,3007 \times \text{triglicéridos}) - (0,0695 \times birth\_wt\ SDS) + (0,3661 \times bl\_wt\ SDS) - (0,6797 \times HORM-REPL) + (0,308 \times \text{dosis})$ ,

en donde el nivel predicho de respuesta se usa para optimizar un plan de cumplimiento y tratamiento, siempre que todas las etapas de identificación y medición se realicen *in vitro*.

3. Un método para predecir el nivel de respuesta al tratamiento con la hormona del crecimiento en un individuo que tiene el síndrome de Turner (TS), comprendiendo el método las etapas de:

- a. identificar que el individuo tiene:
  - el alelo C en la proteína adaptadora 2 de SH2B (SH2B2)\_rs2906713; o
  - el genotipo AA en la subunidad catalítica de 110 kD de fosfatidilinositol-3'-quinasa (PIK3CB)\_rs10513055; o
  - el genotipo GG en la proteína 2 del linfoma de linfocitos B (BCL2)\_rs4456611 o el alelo C en SH2B2\_rs2906713; o
  - el alelo A en BCL2\_rs4456611 y el genotipo AA en PIK3CB\_rs10513055; o
  - el alelo A en BCL2\_rs4456611 y el alelo A en la quinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4)\_rs2069502; o
  - el cariotipo 45X; o
  - un isocromosoma de brazo largo de un cromosoma X (cariotipo i(Xq));
- b. identificar la puntuación de la desviación estándar (SDS) de la proteína 3 de unión al factor de crecimiento insulinoide (IGFBP3) en el punto de partida ("IGFBP3\_SDS\_B");
- c. medir la concentración de triglicéridos en ayunas en el punto de partida en mmol/L ("triglicéridos");
- d. medir la concentración de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) en el punto de partida en mUI/L ("TSH\_B");
- e. aportar la edad en el punto de partida en años ("edad");

- f. aportar la SDS del peso en el punto de partida del tratamiento ("bl\_wt SDS");
- g. ajustar la dosis media prescrita de la hormona del crecimiento en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso/día ("dosis"); y
- h. calcular la SDS predicha de la IGFBP3 después de un mes de tratamiento con la hormona del crecimiento con la fórmula  $\text{IGFBP3\_SDS\_1M} = 1,176 + (0,4658 \times \text{IGFBP3\_SDS\_B}) - (0,182 \times \text{triglicéridos}) + (0,0215 \times \text{TSH\_B}) - (0,0497 \times \text{edad}) + (0,0897 \times \text{bl\_wt SDS}) + (0,0032 \times \text{dosis})$ ,

5 en donde el nivel predicho de respuesta se usa para optimizar un plan de cumplimiento y tratamiento, siempre que todas las etapas de identificación y medición se realicen *in vitro*.