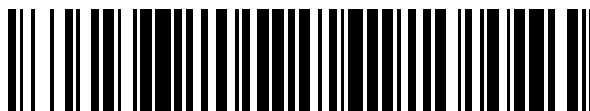


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 268**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2012** **E 12732994 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015** **EP 2718714**

54 Título: **Marcadores para la consolidación de fractura de huesos alterada**

30 Prioridad:

10.06.2011 EP 11169591

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

15.10.2015

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES (25.0%)
Avenue Franklin D. Roosevelt 50
1050 Bruxelles, BE;
BONE THERAPEUTICS S.A. (25.0%);
UNIVERSITÉ DE LIÈGE (25.0%) y
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE
LIÈGE (25.0%)

72 Inventor/es:

GANGJI, VALÉRIE;
HAUZEUR, JEAN-PHILIPPE;
DE SENY, DOMINIQUE;
MATHIEU, MYRIELLE;
INGELS, AUDE;
RIGUTTO, SABRINA;
SPRUYT, DELPHINE;
BASTIANELLI, ENRICO;
ALBARANI, VALENTINA;
PESESSE, XAVIER y
MALAISE, MICHEL

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 548 268 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

Marcadores para la consolidación de fractura de huesos alterada

5 Campo de la invención

La invención se refiere a biomarcadores y parámetros útiles para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de enfermedades y afecciones en sujetos, en particular consolidación de fractura ósea alterada, tal como pero no limitada a fracturas sin consolidación, fracturas de consolidación defectuosa o fracturas de consolidación retrasada; y a métodos, usos, kits y dispositivos relacionados.

Antecedentes de la invención

Existe una necesidad continua para modos adicionales y preferiblemente mejorados para obtener predicción, diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento precisos de enfermedades y afecciones en sujetos para informar y guiar las elecciones de tratamiento.

La consolidación de fractura alterada abarca cualquier anomalía y deficiencia de la consolidación de fractura ósea tal como consolidación de fractura ósea inadecuada, retrasada o ausente, incluyendo sin limitación, consolidaciones defectuosas, consolidaciones retrasadas y pseudoarticulaciones. Las fracturas sin consolidación, también conocidas como pseudoarticulaciones (SA), que incluyen entre otras pseudoarticulaciones herméticas y pseudoarticulaciones inestables (pseudoartrosis), se caracterizan por un fallo de los procesos de reparación de fracturas, sin esperanza de consolidación espontánea. La tasa descrita de pseudoarticulaciones varía entre el 2% y el 10% de todas las fracturas, dependiendo de los autores (Gaston et al. J. Bone Joint Surg. Br., 2007, vol. 89(12), 1553-1560; Tzioupis y Giannoudis. Injury, 2007, vol. 38 Supl 2, S3-S9). Las pseudoarticulaciones se pueden clasificar como hipertróficas u oligotróficas si los sitios de fragmentos óseos son vasculares. Las pseudoarticulaciones hipertróficas habitualmente se explican por una inestabilidad en el sitio de fractura. Las pseudoarticulaciones oligotróficas típicamente se producen después de desplazamiento principal de los sitios de fractura y presentan una respuesta de consolidación inadecuada como se muestra por la ausencia de callo. En las pseudoarticulaciones clasificadas como atróficas, los fragmentos óseos son avasculares, adinámicos e incapaces de reacción biológica (Frolke et al. Injury, 2007, vol. 38 Supl 2, S19-S22).

Las consolidaciones defectuosas se caracterizan por una consolidación imperfecta de un hueso previamente fragmentado. Una consolidación retrasada se puede definir como una fractura en la que la consolidación no se ha producido en el tiempo esperado y el desenlace permanece incierto.

En el proceso de consolidación normal, una fractura ósea inicia una secuencia de inflamación, reparación y remodelado que puede restablecer el hueso lesionado a su estado original. En seres humanos, la fase inflamatoria dura aproximadamente de 5 a 7 días y empieza con el desarrollo de un hematoma y sigue por la invasión de células inflamatorias. Estas células, en asociación con las células locales, secretan citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento para fomentar el reclutamiento de células progenitoras osteogénicas y células progenitoras endoteliales, esenciales para iniciar el proceso de reparación (Einhorn. Clin. Orthop. Relat. Res., 1998, vol. 355 Supl: S7-21). El reclutamiento de células progenitoras se divide en cuatro fases: movilización, migración, invasión e injerto de las células en el sitio de la fractura. La alteración de, entre otros, uno cualquiera o más de los procesos anteriores puede producir consolidación de fractura ósea alterada.

El diagnóstico es actualmente radiológico y se hace después de 3 o 4 meses sin consolidación para consolidaciones retrasadas y después de 6 a 9 meses sin consolidación para pseudoarticulaciones, dependiendo del sitio y el tipo de fractura (Frolke et al., anteriormente). Las pruebas de cribado basado en biomarcadores, clínicamente útiles para la consolidación de fractura ósea alterada no están, según nuestro conocimiento, disponibles. De hecho, el uso de moléculas biológicas como biomarcadores para consolidación de fractura ósea alterada no se ha investigado nunca en pacientes de pseudoarticulaciones (SA). En estudios patofisiológicos, autores han demostrado que los niveles de TGF- β , PDGF, FGF y BMP 2/4 *in situ* eran iguales en sujetos con SA y sanos 1 semana después del traumatismo, pero disminuyeron 8 semanas después en los pacientes de SA (Brownlow et al. Injury, 2001, vol. 32(7), 519-524). Otros autores han mostrado que los niveles en suero de TGF- β , PDGF-AB y FGF eran menores a las 2 y 4 semanas después del traumatismo en pacientes de SA. TGF- β 1 y PDGF-AB están todavía más bajos en pacientes de SA a las 12 semanas después del traumatismo (Weiss et al. Arch. Orthop. Trauma Surg., 2009, vol. 129, 989-997; Zimmermann et al. Bone, 2005, vol. 36(5), 779-785).

Puesto que el conocimiento, indicación o advertencia de que una fractura en un sujeto está o tiene una posibilidad aumentada de mostrar consolidación alterada, tal como evolucionar hacia una pseudoarticulación, puede ayudar las intervenciones terapéuticas en el sujeto, la provisión de métodos y medios adicionales, alternativos y preferiblemente mejorados para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura ósea alterada continúa siendo de importancia fundamental.

Compendio de la invención

Habiendo realizado experimentos y pruebas exhaustivas, los inventores identificaron moléculas biológicas cuyos niveles son casi predictivos y/o indicativos de consolidación alterada de una fractura ósea, y que por tanto constituyen biomarcadores útiles y prometedores para consolidación de fractura alterada. Las frases sinónimas “consolidación de fractura ósea alterada” o “consolidación de fractura alterada” como se usan en el presente documento abarcan cualquier anomalía, anormalidad y deficiencia de la consolidación de una fractura ósea, tal como consolidación de una fractura inadecuada, retrasada o ausente. Las frases pretenden específicamente comprender y preferiblemente indicar consolidaciones defectuosas, consolidaciones retrasadas y pseudoarticulaciones, más preferiblemente indicar pseudoarticulaciones, que incluyen entre otras pseudoarticulaciones herméticas y pseudoarticulaciones inestables (pseudoartrosis).

Según la invención, los métodos y medios adicionales y marcadamente mejorados para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura alterada se realizan mediante la provisión de uno cualquiera o más de factor derivado del estroma 1 (SDF-1 o CXCL12), factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB), interleuquina-8 (IL-8 o CXCL8) e interleuquina-6 (IL-6) como biomarcador(es) para consolidación de fractura ósea alterada.

Por tanto, en el presente documento se proporciona el uso de uno cualquiera o más de SDF-1, PDGF-BB, IL-8 e IL-6 como un biomarcador, más particularmente un biomarcador para consolidación de fractura alterada, incluso más particularmente como un biomarcador para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura alterada. Preferiblemente, en el presente documento se proporciona el uso de IL-8 como un biomarcador, más particularmente como un biomarcador para consolidación de fractura ósea alterada, incluso más particularmente como un biomarcador para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura ósea alterada.

También se proporciona el uso de uno cualquiera o más de SDF-1, PDGF-BB, IL-8 e IL-6 para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura alterada. Preferiblemente, en el presente documento se proporciona el uso de IL-8 para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura ósea alterada.

En formas de realización preferidas de los presentes usos, la consolidación de la fractura ósea alterada se puede seleccionar del grupo que consiste en fractura de consolidación defectuosa, fractura de consolidación retrasada y fractura sin consolidación.

También se proporciona en el presente documento un método para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura alterada en un sujeto que comprende medir el nivel de uno cualquiera o más de SDF-1, PDGF-BB, IL-8, e IL-6 en una muestra de dicho sujeto. Preferiblemente, en el presente documento se proporciona un método para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura ósea alterada en un sujeto que comprende medir el nivel de IL-8 en una muestra de dicho sujeto. Para medir el nivel de uno o más biomarcadores, los métodos presentes, y particularmente la fase de examen de tales métodos en los que se recogen datos de y/o sobre el sujeto, típicamente comprende medir o determinar el nivel (es decir, cantidad, total) de dicho uno o más biomarcador(es) en una muestra del sujeto.

Un método para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura alterada en un sujeto como se enseña en el presente documento en formas de realización preferidas comprende los pasos: (i) medir la cantidad de uno cualquiera o más de SDF-1, PDGF-BB, IL-8 e IL-6 en una muestra del sujeto; (ii) comparar la cantidad medida en (i) con un valor de referencia que representa un diagnóstico, predicción y/o pronóstico conocido de consolidación de fractura alterada; (iii) encontrar una desviación o no desviación de la cantidad medida en (i) del valor de referencia; y (iv) atribuir dicho descubrimiento de desviación o no desviación a un diagnóstico, predicción y/o pronóstico particular de consolidación de fractura alterada en el sujeto. Preferiblemente, un método como se enseña en el presente documento para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura ósea alterada en un sujeto comprende los pasos: (i) medir la cantidad de IL-8 en una muestra del sujeto; (ii) comparar la cantidad medida en (i) con un valor de referencia que representa un diagnóstico, predicción y/o pronóstico conocido de consolidación de fractura ósea alterada; (iii) encontrar una desviación o no desviación de la cantidad medida en (i) del valor de referencia; y (iv) atribuir dicho descubrimiento de desviación o no desviación a un diagnóstico, predicción y/o pronóstico particular de consolidación de fractura ósea alterada en el sujeto. El método también se puede realizar para un sujeto en dos o más puntos temporales sucesivos y los desenlaces respectivos de dichos puntos temporales sucesivos se pueden comparar, por lo cual se determina la presencia o ausencia de un cambio entre el diagnóstico, predicción y/o pronóstico de consolidación de fractura alterada en dichos puntos temporales sucesivos. Cuando se aplica así, el método puede seguir un cambio en el diagnóstico, predicción y/o pronóstico de consolidación de fractura alterada en el sujeto a lo largo del tiempo.

Por ejemplo, una desviación de la cantidad de uno cualquiera o más de SDF-1, PDGF-BB, IL-8 e IL-6, preferiblemente de la cantidad de IL-8, en una muestra de un sujeto comparada con un valor de referencia que representa la predicción o diagnóstico de consolidación de fractura no alterada o que representa un buen pronóstico para consolidación de fractura alterada puede indicar respectivamente que el sujeto tiene consolidación de fractura

alterada o tiene riesgo de tener consolidación de fractura alterada o puede indicar un mal pronóstico para consolidación de fractura alterada en el sujeto. En otro ejemplo, la ausencia de tal desviación del valor de referencia que representa la predicción o diagnóstico de consolidación de fractura no alterada o que representa un buen pronóstico de consolidación de fractura alterada puede indicar respectivamente que el sujeto no tiene consolidación de fractura alterada o no tiene riesgo de tener consolidación de fractura alterada o puede indicar un buen pronóstico de consolidación de fractura alterada en el sujeto. En un aún otro ejemplo, la ausencia de tal desviación de un valor de referencia que representa la predicción o diagnóstico de consolidación de fractura alterada o que representa un mal pronóstico de consolidación de fractura alterada puede indicar respectivamente que el sujeto tiene consolidación de fractura altera o tiene riesgo de desarrollar una consolidación de fractura alterada o puede indicar un mal pronóstico para la consolidación de fractura alterada en el sujeto. Un valor de referencia que representa la predicción o diagnóstico de consolidación de fractura no alterada puede, por ejemplo, representar un estado sano, es decir, un estado sin fractura, o puede representar un estado con una fractura que no es consolidación de fractura alterada. Un valor de referencia que representa la predicción o diagnóstico de consolidación de fractura alterada puede, por ejemplo, representar un estado de enfermedad, es decir, un estado con consolidación de fractura alterada.

Preferiblemente pero sin limitación, los inventores han notado que una cantidad reducida de SDF-1, una cantidad reducida de PDGF-BB, una cantidad elevada de IL-8 y/o una cantidad elevada de IL-6 en una muestra de un sujeto, particularmente en suero o plasma del sujeto, comparado(s) a valor(es) de referencia respectivo(s) que representa(n) la predicción o diagnóstico de consolidación de fractura no alterada, más preferiblemente que representan un estado sano o fractura que consolida normalmente, o que representan un buen pronóstico para consolidación de fractura alterada, puede indicar que el sujeto tiene consolidación de fractura alterada o tiene riesgo de tener una consolidación de fractura alterada o puede indicar un mal pronóstico para consolidación de fractura en el sujeto. Preferiblemente pero sin limitación, los inventores han notado que una cantidad reducida de SDF-1 y/o una cantidad reducida de IL-6 en una muestra de un sujeto, particularmente en el sobrenadante de células osteoblásticas o células madre mesenquimatosas cultivadas obtenidas del sujeto, comparado(s) con los respectivo(s) valor(es) de referencia que representan la predicción o diagnóstico de consolidación de fractura no alterada, más preferiblemente que representan un estado sano o una fractura que consolida normalmente, o que representan un buen pronóstico para consolidación de fractura alterada, puede indicar que el sujeto tiene consolidación de fractura alterada o tiene riesgo de tener una consolidación de fractura alterada o puede indicar un mal pronóstico para consolidación de fractura en el sujeto.

Un método para seguir la consolidación de fractura alterada o para seguir la probabilidad de desarrollar consolidación de fractura alterada en un sujeto como se ensaña en el presente documento puede en formas de realización preferidas comprende los pasos: (i) medir la cantidad de uno cualquiera o más de SDF-1, PDGF-BB, IL-8 e IL-6 en una muestra del sujeto en dos o más puntos temporales sucesivos; (ii) comparar la cantidad medida en (i) entre dichos dos o más puntos temporales sucesivos; (iii) encontrar una desviación o no desviación de la cantidad medida en (i) entre dichos dos o más puntos temporales sucesivos; (iv) atribuir dicho descubrimiento de desviación o no desviación a un cambio en la consolidación de fractura alterada o a un cambio en la probabilidad de desarrollar consolidación de fractura alterada en el sujeto entre los dos o más puntos temporales sucesivos. Preferiblemente, un método como el que se ensaña en el presente documento para seguir la consolidación de fractura ósea alterada o para seguir el riesgo de desarrollar consolidación de fractura ósea alterada en un sujeto puede comprender los pasos: (i) medir la cantidad de IL-8 en una muestra del sujeto en dos o más puntos temporales sucesivos; (ii) comparar la cantidad medida en (i) entre dichos dos o más puntos temporales sucesivos; (iii) encontrar una desviación o no desviación de la cantidad medida en (i) entre dichos dos o más puntos temporales sucesivos; (iv) atribuir dicho descubrimiento de desviación o no desviación a un cambio en la consolidación de fractura ósea alterada o a un cambio en el riesgo de desarrollar consolidación de fractura ósea alterada en el sujeto entre los dos o más puntos temporales sucesivos.

Preferiblemente, pero sin limitación, los inventores han notado que una cantidad reducida de SDF-1, una cantidad reducida de PDGF-BB, una cantidad elevada de IL-8 y/o una cantidad elevada de IL-6 en una muestra de un sujeto, preferiblemente en suero o plasma del sujeto, en uno posterior de dichos dos o más puntos temporales sucesivos comparada con la cantidad respectiva en uno anterior de dichos dos o más puntos temporales sucesivos, puede indicar que el riesgo del sujeto de desarrollar consolidación de fractura alterada ha aumentado.

Preferiblemente, pero sin limitación, los inventores han notado que una cantidad reducida de SDF-1 y/o una cantidad reducida de IL-6 en una muestra de un sujeto, particularmente en sobrenadante de células osteoblásticas o células madre mesenquimatosas cultivadas obtenidas, en uno posterior de dichos dos o más puntos temporales sucesivos comparada con la cantidad respectiva en uno anterior de dichos dos o más puntos temporales sucesivos, puede indicar que el riesgo del sujeto de desarrollar consolidación de fractura alterada ha aumentado.

También se divulga un método para determinar si un sujeto está o no está (por como, por ejemplo, aún está o ya no está) en necesidad de un tratamiento terapéutico o profiláctico (preventivo) de consolidación de fractura que comprende medir el nivel de uno cualquiera o más de SDF-1, PDGF-BB, IL-8 e IL-6 en una muestra de dicho sujeto. En formas de realización preferidas el método puede comprender los pasos: (i) medir la cantidad de uno cualquiera o más de SDF-1, PDGF-BB, IL-8 e IL-6 en una muestra del sujeto; (ii) comparar la cantidad medida en (i) con un valor de referencia que representa un diagnóstico, predicción y/o pronóstico conocido de consolidación de fractura

alterada; (iii) encontrar una desviación o no desviación de la cantidad medida en (i) del valor de referencia; (iv) inferir de dicho descubrimiento la presencia o ausencia de una necesidad para un tratamiento terapéutico o profiláctico de consolidación de fractura alterada. Preferiblemente, un método para determinar si un sujeto está o no está en necesidad de un tratamiento terapéutico o profiláctico de consolidación de fractura ósea alterada puede comprender medir el nivel de IL-8 en una muestra de dicho sujeto, preferiblemente puede comprender los pasos: (i) medir la cantidad de IL-8 en la muestra del sujeto; (ii) comparar la cantidad medida en (i) con un valor de referencia que representa un diagnóstico, predicción y/o pronóstico conocido de consolidación de fractura ósea alterada; (iii) encontrar una desviación o no desviación de la cantidad medida en (i) del valor de referencia; (iv) inferir de dicho descubrimiento la presencia o ausencia de una necesidad para un tratamiento terapéutico o profiláctico de consolidación de fractura ósea alterada. Un tratamiento puede estar particularmente indicado donde el método permite una conclusión de que el sujeto tiene consolidación de fractura alterada o tiene riesgo de tener una consolidación de fractura alterada o tiene un mal pronóstico para consolidación de fractura alterada.

En este contexto se divulga además un método para determinar el desenlace de un tratamiento terapéutico o profiláctico de consolidación de fractura alterada en un sujeto, que comprende medir el nivel de uno cualquiera o más de SDF-1, PDGF-BB, IL-8 e IL-6, preferiblemente el nivel de IL-8, en una muestra de dicho sujeto.

En formas de realización preferidas de los métodos presentes, la consolidación de fractura ósea alterada se puede seleccionar del grupo que consiste en fractura con consolidación defectuosa, fractura con consolidación retrasada, y fractura sin consolidación.

Los tratamiento de consolidación de fractura alterada incluyen, entre otros, tratamiento no invasivos tal como, por ejemplo, estimulación eléctrica, ultrasonidos o férulas especializadas, y medidas invasivas, tal como, por ejemplo, eliminación quirúrgica de tejido muerto, inserción de férula interna (por ejemplo, varilla, placa o tornillo), inserción de injerto de hueso, inyección de una o más proteínas morfogenéticas óseas (BMP), o amputación para prevenir lesión adicional. Preferiblemente pero sin limitación, los inventores han notado que una cantidad reducida de SDF-1, una cantidad reducida de PDGF-BB, una cantidad elevada de IL-8 y/o una cantidad elevada de IL-6 en una muestra de un sujeto, particularmente en suero o plasma del sujeto, comparada(s) con el/los respectivo(s) valor(es) de referencia que representan la predicción o diagnóstico de consolidación de fractura no alterada, más preferiblemente que representan un estado sano, o que representan un buen pronóstico para consolidación de fractura alterada, puede indicar que el sujeto necesita un tratamiento terapéutico o profiláctico de consolidación de fractura alterada.

Preferiblemente pero sin limitación, los inventores han notado que una cantidad reducida de SDF-1 y/o una cantidad reducida de IL-6 en una muestra de un sujeto, particularmente en el sobrenadante de células osteoblásticas o células madre mesenquimatosas cultivadas obtenidas del sujeto, comparada(s) con el/los respectivo(s) valor(es) que representan la predicción o diagnóstico de consolidación de fractura no alterada, más preferiblemente que representan un estado sano, o que representan un buen pronóstico para la consolidación de fractura alterada, puede indicar que el sujeto necesita un tratamiento terapéutico o profiláctico de consolidación de fractura alterada.

Uno cualquiera o más de SDF-1, PDGF-BB, IL-8 y/o IL-6 puede mostrar su valor diagnóstico, predictivo, pronóstico y/o de seguimiento en la consolidación de fractura ósea alterada, antes de la fractura o después de la fractura. En formas de realización no limitantes, uno cualquiera o más de SDF-1, PDGF-BB, IL-8 y/o IL-6 se pueden evaluar particularmente en sujetos entre el momento de la fractura y aproximadamente 40 meses después de la fractura, tal como a aproximadamente 1, 2, 3 y/o 4 semanas después de la fractura, y/o a aproximadamente de 1 a 4 meses, aproximadamente de 5 a 8 meses, aproximadamente de 9 a 12 meses, aproximadamente de 13 a 16 meses, aproximadamente de 17 a 20 meses, aproximadamente de 21 a 24 meses, aproximadamente de 25 a 28 meses, aproximadamente de 29 a 32 meses, aproximadamente de 33 a 36 meses y/o aproximadamente de 37 a 40 meses después de la fractura.

Cualquiera de los presentes biomarcadores, usos y métodos se puede combinar preferiblemente con o puede complementar, o se puede programar al mismo tiempo que, una o más otras medidas diagnósticas para consolidación de fractura alterada, tal como, sin limitación, técnicas radiológicas y de imagenología convencionales incluyendo rayos X, escáneres de tomografía de emisión de positrones (TEP), escáneres de tomografía computarizada (TAC), resonancia magnética (RM), ecografía.

Uno cualquiera o más de los biomarcadores, usos y métodos divulgados en el presente documento pueden ser particularmente útiles en sujetos que se sabe o espera que tengan riesgo de desarrollar consolidación de fractura ósea alterada, por ejemplo, que tienen uno o más factores de riesgo para consolidación de fractura ósea alterada. Sin limitación los factores de riesgo asociados con consolidación de fractura ósea alterada incluyen factores de estilo de vida y salud que pueden interferir con la consolidación ósea, tal como, entre otros, tabaquismo, abuso de alcohol, mal estado nutricional, mala salud general, falta de buena forma, y diabetes; factores que pueden contribuir a la pérdida de la fortaleza de los huesos, tal como entre otros, el uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), uso de fármacos inmunosupresores, otros fármacos tal como anticonvulsivos, y la sustitución de la hormona del tiroides, tiroxina; el tipo y sitio de fractura tal como fractura en un sitio mal vascularizado, inestabilidad en el sitio de fractura, traumatismo de alta energía, y mal estado de los tejidos blandos alrededor del hueso; ascendencia tal como individuos de ascendencia europea y asiática que tienen riesgo aumentado para osteoporosis; edad tal como

individuos ancianos que tiene riesgo aumentado de mala consolidación ósea; mujeres que han experimentado menopausia temprana, menarquia tardía, o la pérdida de los ovarios y que tienen riesgo aumentado de debilidad ósea; etc.

- 5 En formas de realización, uno o cualquiera o más de los biomarcadores, usos y métodos presentes se puede complementar o combinar con la determinación de la presencia o ausencia y/o el nivel de uno o más factores de riesgo para consolidación de fractura ósea alterada en un sujeto.
- 10 Cualquiera de los biomarcadores, usos y métodos presentes puede preferiblemente permitir una sensibilidad y/o especificidad (preferiblemente, sensibilidad y especificidad) de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70% o al menos el 80%, por ejemplo, $\geq 85\%$ o $\geq 90\%$ o $\geq 95\%$, por ejemplo, entre aproximadamente el 80% y el 100% o entre aproximadamente el 85% y el 95%.
- 15 Cualquiera de los biomarcadores, usos y métodos presentes se puede aplicar a sujetos que no han sido aún diagnosticados como que tienen consolidación de fractura ósea alterada (por ejemplo, cribado preventivo), o que han experimentado una fractura, o que han sido diagnosticados como que tienen consolidación de fractura ósea alterada, o que se sospecha que tienen consolidación de fractura ósea alterada (por ejemplo, muestran uno o más signos y/o síntomas característicos), o que tienen riesgo de desarrollar consolidación de fractura ósea alterada (por ejemplo, predisposición genética; presencia de uno o más factores de riesgo de desarrollo, medioambientales o de comportamiento). Cualquiera de los biomarcadores, usos y métodos presentes también se puede usar para detectar varias fases de evolución o gravedad de consolidación de fractura ósea alterada; para detectar respuesta de consolidación de fractura a tratamiento profilácticos o terapéuticos u otras intervenciones; para ayudar al médico a decidir tras el empeoramiento, *statu quo*, recuperación parcial, o recuperación completa del sujeto de consolidación de fractura alterada, resultante en bien tratamiento adicional u observación o alta hospitalaria del sujeto de un centro médico. Además, cualquiera de los biomarcadores, usos y métodos presentes se puede emplear para cribados de población, tal como, por ejemplo, cribado en una población general o en una población estratificada basada en uno o más criterios, por ejemplo, edad, ascendencia, ocupación, presencia o ausencia de factores de riesgo de consolidación de fractura alterada, etc.
- 20
- 25
- 30 Cualquiera de los biomarcadores, usos y métodos presentes también se puede beneficiar de ser además complementado o combinado con la evaluación de uno o más de otros biomarcadores, signos, síntomas y/o parámetros clínicos relevantes para la consolidación de fractura alterada. A modo de ejemplo y no limitación, los biomarcadores potencialmente útiles en evaluar consolidación de fractura alterada, y cuya cantidad se puede medir ventajosamente en los presente usos y métodos, incluyen uno cualquiera o más de factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , otras isoformas del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (otras isoformas), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y proteína morfogenética ósea (BMP), cuyos niveles se han descrito disminuidos en pacientes con consolidación de fractura alterada (Brownlow et al. 2001; Weiss S et al. 2009; Zimmermann et al. 2005; todos anteriormente).
- 35
- 40 Por tanto, en ciertas formas de realización se proporcionan los usos y métodos como se definen en el presente documento, que comprenden además medir el nivel de uno cualquiera o más de FGF- β , PDGF, FGF y BMP en una muestra del sujeto.
- 45 También se pretenden en ciertas formas de realización los usos y métodos como se definen en el presente documento, que comprenden además medir el nivel de uno cualquiera o más de SDF-1, PDGF-BB, IL-6, FGF- β , PDGF, FGF y BMP en una muestra del sujeto.
- 50 La respectiva cantidad de uno cualquiera o más de los presentes biomarcadores se puede evaluar por separado e individualmente, es decir, cada cantidad comparada con su valor de referencia correspondiente. De otra manera, las cantidades de dos cualquiera o más de los presentes biomarcadores se pueden usar para establecer un perfil de biomarcadores, que se puede comparar adecuadamente con un valor de referencia multiparámetro correspondiente. Alternativamente, las cantidades de dos cualquiera o más biomarcadores se pueden modular cada uno por un factor de ponderación apropiado y sumar para dar un único valor, que después se puede comparar adecuadamente con un valor de referencia correspondiente obtenido en consecuencia. Se apreciará que tales factores de ponderación
- 55 pueden depender de la metodología usada para cuantificar los biomarcadores, y para cada marco experimental particular se puede determinar y comprender en un modelo adecuado para el diagnóstico, predicción y/o pronóstico de consolidación de fractura alterada.
- 60 Se pueden establecer valores de referencia como los empleados en el presente documento según procedimientos conocidos previamente empleados para otros biomarcadores. Los valores de referencia se pueden establecer bien dentro de (es decir, constituyendo un paso de) o externos a (es decir, no constituyendo un paso de) los usos y métodos enseñados en el presente documento. Según esto, cualquiera de los usos o métodos enseñados en el presente documento puede comprender un paso de establecer un valor de referencia preciso.
- 65 Por tanto, también se proporciona un método para establecer un valor de referencia para uno cualquiera o más biomarcadores como se enseña en el presente documento, dicho valor de referencia representa:

- (a) una predicción o diagnóstico de la ausencia de consolidación de fractura alterada o un buen pronóstico para consolidación de fractura alterada, o
- (b) una predicción o diagnóstico de consolidación de fractura alterada o un mal pronóstico para consolidación de fractura alterada,

que comprende:

- (i) medir la cantidad de uno o más biomarcadores en una muestra de:

- (i a) uno o más sujetos que no tienen consolidación de fractura alterada o que no tienen riesgo de tener consolidación de fractura alterada o que tienen un buen pronóstico para consolidación de fractura alterada, o

- (i b) uno o más sujetos que tienen consolidación de fractura alterada o que tienen riesgo de tener consolidación de fractura alterada o que tienen un mal pronóstico para consolidación de fractura alterada, y

- (ii a) establecer de la cantidad del uno o más biomarcadores medidos en (i a) el valor de referencia que representa la predicción o diagnóstico de la ausencia de consolidación de fractura alterada o que representa el buen pronóstico para la consolidación de fractura alterada, o

- (ii b) establecer de la cantidad del uno o más biomarcadores medidos en (i b) el valor de referencia que representa la predicción o diagnóstico de consolidación de fractura alterada o que representa el mal pronóstico para la consolidación de fractura alterada.

Preferiblemente, también se proporciona en el presente documento un método para establecer un valor de referencia para IL-8, dicho valor de referencia representa:

- (a) una predicción o diagnóstico de la ausencia de consolidación de fractura alterada o un buen pronóstico para consolidación de fractura alterada, o

- (b) una predicción o diagnóstico de consolidación de fractura alterada o un mal pronóstico para consolidación de fractura alterada,

que comprende:

- (i) medir la cantidad de IL-8 en una muestra de:

- (i a) uno o más sujetos que no tienen consolidación de fractura alterada o que no tienen riesgo de tener consolidación de fractura alterada o que tienen un buen pronóstico para consolidación de fractura alterada, o

- (i b) uno o más sujetos que tienen consolidación de fractura alterada o que tienen riesgo de tener consolidación de fractura alterada o que tienen un mal pronóstico para consolidación de fractura alterada, y

- (ii a) establecer de la cantidad de IL-8 medida en (i a) el valor de referencia que representa la predicción o diagnóstico de la ausencia de consolidación de fractura alterada o que representa el buen pronóstico para la consolidación de fractura alterada, o

- (ii b) establecer de la cantidad la IL-8 medida en (i b) el valor de referencia que representa la predicción o diagnóstico de consolidación de fractura alterada o que representa el mal pronóstico para la consolidación de fractura alterada.

En formas de realización preferidas, los presentes usos y métodos pueden medir la cantidad sistémica de uno o más biomarcadores como se enseña en el presente documento. Preferiblemente, los presentes usos y métodos pueden medir la cantidad sistémica de IL-8. La cantidad sistémica de uno o más biomarcadores, preferiblemente IL-8, se puede evaluar adecuadamente en muestras que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en sangre completa o un componentes fraccional de la misma, tal como preferiblemente plasma o suero.

En otras formas de realización, los presentes usos y métodos pueden medir la cantidad local de uno o más biomarcadores como se enseña en el presente documento en el sitio de la fractura de consolidación alterada. Preferiblemente, los presentes usos y métodos pueden medir la cantidad local de IL-8 en el sitio de fractura de consolidación alterada. La cantidad local de uno o más biomarcadores, preferiblemente IL-8, se puede determinar adecuadamente en muestras que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en tejido retirado del sitio de fractura de consolidación alterada, tal como tejido obtenido por biopsia u otras técnicas de recuperación de tejido.

En otras formas de realización, los presentes usos y métodos pueden medir la cantidad en médula ósea de uno o más biomarcadores como se enseña en el presente documento en un sitio diferente de recogida de médula ósea. Preferiblemente, los presentes usos y métodos pueden medir la cantidad en médula ósea de IL-8 en diferentes sitios de recogida de médula ósea. La médula ósea se puede obtener del hueso que tiene la fractura de consolidación alterada en el sujeto, o de un sitio distante de dicha fractura de consolidación alterada.

En aún formas de realización adicionales, los presentes uso y métodos pueden medir la cantidad de uno o más biomarcadores como se enseña en el presente documento en células o en el sobrenadante de células obtenidas del sujeto y posteriormente cultivadas *in vitro*. Preferiblemente, los presentes usos y métodos pueden comprender medir la cantidad de IL-8 en células o en el sobrenadante de células obtenidas del sujeto y posteriormente cultivadas *in vitro*. Preferiblemente, las células pueden ser células o progenitores de tejido óseo, más preferiblemente osteoblastos (OB) o células madre mesenquimatosas (MSC). Preferiblemente, los biomarcadores se pueden medir en cultivos primarios y/o adicionales (por ejemplo, secundarios, terciarios, etc.) de las células. Las células se pueden obtener del sitio de la fractura de consolidación alterada en el sujeto, o de un sitio distante de dicha fractura de consolidación alterada.

Además se divulga un kit, particularmente un kit para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura alterada en un sujeto, el kit comprende (i) medios para medir la cantidad de uno cualquiera o más de SDF-1, PDGF-BB, IL-8 y/o IL-6, particularmente en una muestra del sujeto, y (ii) opcional y preferiblemente uno o más valores de referencia o medios para establecer dicho uno o más valores de referencia, en donde dicho uno o más valores de referencia representan un diagnóstico, predicción y/o pronóstico conocido de consolidación de fractura alterada.

Los medios para medir la cantidad de un biomarcador pueden comprender uno o más agentes de unión capaces de unirse específicamente a dicho biomarcador. Los agentes de unión ejemplares pueden incluir sondas de hibridación (oligonucleótidos), cebadores de amplificación, anticuerpos, aptámeros, fotoaptámeros, proteínas, péptidos, peptidomiméticos o moléculas pequeñas. Los agentes de unión pueden estar ventajosamente inmovilizados sobre una fase o soporte sólido.

Por tanto, también se divulga un kit, particularmente un kit para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura alterada en un sujeto, el kit comprende (i) uno o más agentes de unión capaces de unirse específicamente a uno cualquiera o más de SDF-1, PDGF-BB, IL-8 y/o IL-6, particularmente en una muestra del sujeto, (ii) preferiblemente, una cantidad o concentración conocida de dicho uno cualquiera o más de SDF-1, PDGF-BB, IL-8 y/o IL-6, tal como para su uso como controles, estándares y/o calibradores, (iii) opcional y preferiblemente, uno o más valores de referencias o medios para establecer dicho uno o más valores de referencia, en donde dichos uno o más valores de referencia representan un diagnóstico, predicción y/o pronóstico conocido de consolidación de fractura alterada. Dichos componentes bajo (i) y/o (ii) pueden estar adecuadamente marcados como se enseña en otra parte en esta especificación.

En formas de realización preferidas, los kits se pueden configurar como dispositivos portátiles, tal como, por ejemplo, dispositivos de cabecera, para su uso en casa o en marcos clínicos.

Se apreciará que los medios o herramientas para recoger una muestra de un sujeto, tal como por ejemplo, un tubo de recogida de sangre convencional que comprende un agente anticoagulante se pueden proporcionar por separado o pueden estar comprendidos en los kits divulgados en el presente documento.

Además se divulga el uso de cualquier kit descrito en el presente documento para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura alterada.

Preferiblemente, se proporciona el uso de un kit para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura ósea alterada en un sujeto, el kit comprende (i) medios para medir la cantidad de IL-8, particularmente en una muestra del sujeto, y (ii) opcional y preferiblemente uno o más valores de referencia o medios para establecer dichos uno o más valores de referencia, en donde dichos uno o más valores de referencia representan un diagnóstico, predicción y/o pronóstico conocido de consolidación de fractura ósea alterada. Además se proporciona el uso como se enseña en el presente documento, en donde medios para recoger una muestra de un sujeto se proporcionan por separado o están comprendidos en el kit.

También se divulgan reactivos y herramientas útiles para medir uno cualquiera o más biomarcadores como se enseña en el presente documento. Por tanto, se divulga una matriz o micromatriz de ácidos nucleicos o una matriz o micromatriz de proteínas, polipéptidos o péptidos que comprende uno cualquiera, preferiblemente dos cualquiera, preferiblemente tres cualquiera, más preferiblemente los cuatro de SDF-1, PDGF-BB, IL-8 y/o IL-6. También se divulga una matriz o micromatriz de agentes de unión que comprende uno o más agentes de unión capaces de unirse específicamente a uno cualquiera, preferiblemente dos cualquiera, preferiblemente tres, más preferiblemente los cuatro de SDF-1, PDGF-BB, IL-8 y/o IL-6, preferiblemente que comprende una cantidad o concentración conocida de los dichos uno o más agentes de unión.

Además se divulga el uso de cualquier matriz o micromatriz como se describe en el presente documento para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura alterada.

Preferiblemente, se proporciona el uso de una matriz o micromatriz de ácidos nucleicos o una matriz o micromatriz de proteínas, polipéptidos o péptidos para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de

fractura ósea alterada, dicha matriz o micromatriz comprende un ácido nucleico que codifica IL-8 o comprende IL-8. Preferiblemente, también se proporciona el uso de una matriz o micromatriz de agentes de unión para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura ósea alterada, dicha matriz o micromatriz comprende uno o más agentes de unión capaces de unirse específicamente a IL-8, preferiblemente comprende una cantidad o concentración conocida de dichos uno o más agentes de unión.

Los aspectos anteriores y adicionales y las formas de realización preferidas de la invención se describen en las siguientes secciones y en las reivindicaciones adjuntas. El objeto de las reivindicaciones adjuntas se incorpora por este medio específicamente en esta especificación.

Breve descripción de las figuras

La **figura 1** ilustra los niveles en plasma de SDF-1 en un experimento que compara un grupo de pacientes de pseudoarticulación (SA) con controles sanos (VS), (A) todas las muestras (VS, n = 49; SA, n = 15), (B) muestras donde el plasma se recoge en tubos con heparina (VS, n = 26; SA, N = 11), (C) muestras donde el plasma se recoge en tubos con EDTA (VS, n = 40; SA, n = 5).

La **figura 2** ilustra los niveles en suero de PDGF-BB en un experimento que compara un grupo de pacientes de pseudoarticulación (SA, n = 9) con controles sanos (VS, n = 20).

La **figura 3** ilustra los niveles en suero de IL-8 en un experimento que compara un grupo de pacientes de pseudoarticulación (SA, n = 4) con controles sanos (VS, n = 18).

La **figura 4** ilustra los niveles en suero de IL-6 en un experimento que compara un grupo de pacientes de pseudoarticulación (SA, n = 13) con controles sanos (VS, n = 29).

La **figura 5A** ilustra los niveles de SDF-1 en sobrenadante de cultivo de células osteoblásticas (OB) que compara un grupo de pacientes de pseudoarticulación (SA, N = 6) con controles sanos (VS, n = 9).

La **figura 5B** ilustra los niveles de SDF-1 en sobrenadante de cultivo de células mesenquimatosas (MSC) que compara un grupo de pacientes de pseudoarticulación (SA, N = 6) con controles sanos (CS, n = 9).

La **figura 6** ilustra los niveles de IL-6 en sobrenadante de cultivo de células osteoblásticas (OB) que compara un grupo de pacientes de pseudoarticulación (SA, n = 6) con controles sanos (VS, n = 10).

Descripción detallada de la invención

Como se usa en el presente documento, las formas singulares, "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes tanto singulares como plurales a menos que el contexto claramente imponga otra cosa.

Los términos "comprender", "comprende" y "compuesto de" como se usa en el presente documento son sinónimos de "incluir", "incluye" o "contener", "contiene", y son inclusivos o abiertos y no excluyen miembros, elementos o pasos de método adicionales, no enumerados. El término también abarca "consistir en" y "consistir esencialmente en".

La enumeración de intervalos numéricos por puntos finales incluye todos los números y fracciones subsumidas en los intervalos respectivos, así como los puntos finales enumerados.

El término "aproximadamente" como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal, y similar, se pretende que abarque variaciones de y desde el valor especificado, en particular variaciones del +/- 10% o menos, preferiblemente +/-5% o menos, más preferiblemente +/-1% o menos, y aún más preferiblemente +/- 0,1% o menos de y desde el valor especificado, en tanto que tales variaciones son apropiadas para desempeñar en la invención divulgada. Se debe entender que el valor al que se refiere el modificador "aproximadamente" también se divulga él mismo específica y preferiblemente.

Mientras que el término "uno o más", tal como uno o más miembros de un grupo de miembros, está claro por sí, por medio de ejemplificación adicional, el término abarca, entre otros, una referencia a uno cualquiera de dichos miembros, o dos cualquiera o más de dichos miembros, tal como, por ejemplo, cualesquiera ≥ 3 , ≥ 4 , ≥ 5 , ≥ 6 o ≥ 7 , etc., de dichos miembros, y hasta todos de dichos miembros.

A menos que especifique de otra manera, todos los términos usados en divulgar la invención, incluyendo términos técnicos y científicos, tienen el significado que comúnmente entiende el experto en la materia a la que pertenece esta invención. Mediante orientación adicional, se pueden incluir definiciones de términos para apreciar mejor la enseñanza de la presente invención.

Los inventores identificaron factor derivado del estroma (SDF-1), factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB), interleuquina- 8 (IL-8) e interleuquina 6 (IL-6) como biomarcador(es) novedoso(s), útil(es) para el

diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura ósea alterada. En particular, los inventores identificaron IL-8 como biomarcador novedoso, útil para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura ósea alterada.

El término “biomarcador” está extendido en la técnica y puede indicar en términos generales una molécula biológica y/o una parte detectable de la misma cuya evaluación cualitativa y/o cuantitativa en un sujeto es, sola o combinada con otros datos, predictiva y/o informativa (por ejemplo, predictiva, diagnóstica y/o pronóstica) con respecto a uno o más aspectos de fenotipo y/o genotipo del sujeto, tal como, por ejemplo, con respecto al estado del sujeto respecto a una enfermedad o afección determinada. Particularmente, los biomarcadores como se pretende en el presente documento pueden estar basados en ARN (esp. basados en ARNm), o preferiblemente pueden estar basados en proteína, polipéptido o péptido.

Los términos “fractura sin consolidación”, “no consolidación de fractura”, “seudoarticulación” o “SA” intercambiamente se refieren a una fractura que debido a varios factores falla en consolidarse en un periodo de tiempo normal. SA incluye entre otras pseudoarticulaciones herméticas y pseudoarticulaciones inestables o pseudoartrosis. Los términos “fractura con consolidación defectuosa”, “consolidación defectuosa de fractura” o “consolidación defectuosa” intercambiamente se refieren a una consolidación imperfecta de hueso previamente fragmentado. Los términos “fractura de consolidación retrasada” o “consolidación retrasada” intercambiamente se refieren a una fractura en la que la consolidación no se ha producido en el tiempo esperado y el desenlace permanece incierto. Las fracturas sin consolidación, de consolidación defectuosa y de consolidación retrasada están abarcadas en el presente documento mediante el término “consolidación de fractura ósea alterada” o “consolidación de fractura alterada”. Por tanto, la consolidación de fractura alterada requiere alguna forma de intervención para estimular la consolidación.

El periodo de tiempo en el que la consolidación de fractura alterada concluye en la práctica varía dependiendo de la fractura particular, pero generalmente se acepta que una fractura no consolidada a los 6 meses después de la lesión no consolidará sin intervención. También se ha sugerido concluir que se producirá la consolidación de fractura alterada si una fractura no muestra signos de evolucionar hacia la consolidación a los 3 meses después de la lesión, o simplemente si una fractura no ha consolidado en el tiempo que un cirujano experto en fracturas esperaría que consolidara.

La referencia a lo largo de esta especificación a enfermedades o afecciones abarca cualquiera de tales enfermedades o afecciones como se divulgan en el presente documento en tanto sean consistentes con el contexto de una enumeración particular, más específicamente abarca consolidación de fractura alterada.

Los términos “predecir” o “predicción”, “diagnosticar” o “diagnóstico” y “pronosticar” o “pronóstico” son comunes y se entienden bien en la práctica médica y clínica. Se debe entender que la frase “un método para el diagnóstico, predicción y/o pronóstico” de una enfermedad o afección determinada también se puede intercambiar con frases tal como “un método para diagnosticar, predecir y/o pronosticar” dicha enfermedad o afección o “un método para hacer (o determinar o establecer) el diagnóstico, predicción y/o pronóstico” de dicha enfermedad o afección, o similares.

A modo de explicación adicional y sin limitación, “predecir” o “predicción” generalmente se refiere a una declaración, indicación o presagio avanzado de una enfermedad o afección en un sujeto que (aún) no tiene dicha enfermedad o afección. Por ejemplo, una predicción de una enfermedad o afección en un sujeto puede indicar una probabilidad, posibilidad o riesgo de que el sujeto desarrolle dicha enfermedad o afección, por ejemplo, en un cierto periodo de tiempo o a una cierta edad. Dicha probabilidad, posibilidad o riesgo se puede indicar, entre otros, como un valor absoluto, intervalo o estadística, o puede estar indicado relativo a un sujeto o población de sujetos control adecuado (tal como, por ejemplo, relativo a un sujeto o población de sujetos general, normal o sano). Por tanto, la probabilidad, posibilidad o riesgo de que un sujeto desarrolle una enfermedad o afección se puede indicar ventajosamente como aumentada o disminuida, como veces aumentada o veces disminuida relativa a un sujeto o población de sujetos control adecuada. Como se usa en el presente documento, el término “predicción” de las afecciones o enfermedades como se enseña en el presente documento en un sujeto también puede significar particularmente que el sujeto tiene una predicción ‘positiva’ de tal, es decir, que el sujeto está en riesgo de tener tal (por ejemplo, el riesgo está significativamente aumentado respecto a un sujeto o población de sujetos control). El término “predicción de ninguna” enfermedad o afección como se enseña en el presente documento como se describe en el presente documento en un sujeto puede significar particularmente que el sujeto tiene una predicción ‘negativa’ de tal, es decir, que el riesgo del sujeto de tener tal no está significativamente aumentado respecto a un sujeto o población de sujetos control.

Los términos “diagnosticar” o “diagnóstico” generalmente se refieren al proceso o acto de reconocer, decidir sobre o concluir sobre una enfermedad o afección en un sujeto en base a los síntomas y signos y/o de resultados de varios procedimientos diagnósticos (tal como, por ejemplo, de saber la presencia, ausencia y/o cantidad de uno o más biomarcadores característicos de la enfermedad o afección diagnosticada). Como se usa en el presente documento, “diagnóstico de” las enfermedades o afecciones como se enseña en el presente documento en un sujeto puede significar particularmente que el sujeto tiene tal, por tanto, se diagnostica como que tiene tal. El “diagnóstico de ninguna” enfermedad o afección como se enseña en el presente documento en un sujeto puede significar

particularmente que el sujeto no tiene tal, por tanto, se diagnostica como que no tiene tal. Un sujeto se puede diagnosticar como que no tiene tal a pesar de mostrar uno o más síntomas o signos convencionales reminiscentes de tal.

- 5 Los términos “pronosticar” o “pronóstico” generalmente se refieren a una anticipación sobre la evolución de una enfermedad o afección y el prospecto (por ejemplo, la probabilidad, duración, y/o grado) de recuperación. Un buen pronóstico de las enfermedades o afecciones enseñadas en el presente documento generalmente puede abarcar la anticipación de una recuperación parcial o completa satisfactoria de las enfermedades o afecciones, preferiblemente en un periodo de tiempo aceptable. Un buen pronóstico de tal puede abarcar más comúnmente la anticipación de no empeoramiento o agravamiento adicional de tal, preferiblemente en un periodo de tiempo determinado. Un mal pronóstico de las enfermedades o afecciones enseñadas en el presente documento puede abarcar generalmente la anticipación de una recuperación subestándar y/o recuperación insatisfactoriamente lenta, o sustancialmente no recuperación o incluso empeoramiento adicional de tal.
- 10
- 15 Por tanto, la predicción o pronóstico de una enfermedad o afección puede entre otros, permitir predecir o hacer un pronóstico de la aparición de la enfermedad o afección, o predecir o hacer un pronóstico de la evolución, agravación, alivio o recaída de la enfermedad o afección o la respuesta al tratamiento o a otros factores, situaciones o agentes estresantes externos o internos, etc.
- 20 Además, seguir una enfermedad o afección puede permitir, entre otros, predecir la aparición de la enfermedad o afección, o seguir la evolución, agravación, alivio o recaída de la enfermedad o afección, o respuesta al tratamiento o a otros factores, situaciones o agentes estresantes externos o internos, etc. Ventajosamente, el seguimiento se puede aplicar en el curso de un tratamiento médico de un sujeto, preferiblemente tratamiento médico dirigido a aliviar la enfermedad o afección así seguida. Tal seguimiento puede estar comprendido, por ejemplo, en la toma de
- 25 decisiones de si a un paciente se le puede dar el alta, necesita un cambio en tratamiento o necesita hospitalización adicional. Como se pretende en el presente documento, una referencia al seguimiento de una enfermedad o afección también incluye específicamente seguimiento de la probabilidad, riesgo o posibilidad de que un sujeto desarrolle la enfermedad o afección, es decir, seguir el/los cambio(s) en dicha probabilidad, riesgo o posibilidad a lo largo del tiempo.
- 30 El término “sujeto” o “paciente” como se usa en el presente documento típica y preferiblemente indica seres humanos, pero también puede abarcar referencia a animales no humanos, preferiblemente animales de sangre caliente, más preferiblemente vertebrados, incluso más preferiblemente mamíferos, tal como, por ejemplo, primates no humanos, roedores, caninos, felinos, equinos, ovinos, porcinos, y similares. Particularmente se pretenden sujetos que se sabe o sospecha que han padecido una fractura ósea, más particularmente en donde la fractura ósea no ha consolidado (establecido, por ejemplo, mediante investigación radiológica). Los sujetos adecuados pueden incluir los que se presentan a un médico con síntomas y signos indicativos de fractura ósea sin consolidar o consolidación alterada de fractura ósea.
- 35
- 40 Los términos “muestra” o “muestra biológica” como se usan en el presente documento incluye cualquier muestra biológica obtenida de un sujeto. Las muestras biológicas ejemplares incluyen, sin limitación, sangre completa, plasma, suero, glóbulos rojos, glóbulos blancos (por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica), médula ósea completa, suero y células madre derivados de médula ósea, saliva, orina, heces, lágrimas, sudor, sebo, aspirado de pezón, lavado ductal, exudados de tumor, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, linfa, aspirado de
- 45 aguja fina, líquido amniótico, cualquier otro líquido corporal, uñas cortadas, lisados celulares, productos de secreción celular, líquido de inflamación, secreciones vaginales, biopsias, biopsias de hueso, tejidos de hueso, homogenizados de tejido, etc. Las muestras preferidas pueden incluir las que comprenden uno cualquiera o más biomarcadores como se enseña en el presente documento en cantidades detectables. Las muestras más preferidas, particularmente para la determinación de niveles sistémicos de biomarcadores, incluyen sangre completa o un componente fraccional de la misma, tal como en particular preferiblemente plasma o suero. En algunas formas de realización, una muestra puede comprender o puede estar representada por células o sobrenadante de células, dichas células (preferiblemente MSC u OB) se han obtenido del sujeto y posteriormente cultivado *in vitro*. Preferiblemente, las células se pueden evaluar durante el cultivo primario y/o secundario. Preferiblemente una muestra es fácilmente obtenible por métodos mínimamente invasivos, que permiten retirar o aislar dicha muestra del
- 50 sujeto.
- 55 Una molécula o analito tal como un metabolito, ácido nucleico, ARN, ADN o ADNc, proteína, polipéptido o péptido, se “mide” en una muestra cuando la presencia o ausencia y/o cantidad de dicha molécula o analito o de dicho grupo de moléculas o analitos se detecta o determina en la muestra, preferiblemente sustancialmente a la exclusión de otras moléculas o analitos. Por ejemplo, se puede medir un biomarcador midiendo el ARNm que codifica el mismo, o midiendo la proteína o polipéptido codificado o un péptido del mismo.
- 60
- Los términos “cantidad”, “total” y “nivel” son sinónimos y generalmente bien entendidos en la técnica. Con respecto a moléculas o analitos, los términos se pueden referir particularmente a una cuantificación absoluta de la molécula o analito en una muestra, o a una cuantificación relativa de la molécula o analito en la muestra, es decir, relativo a otro valor tal como relativo a un valor de referencia como se enseña en el presente documento, o a un intervalo de
- 65

valores que indican expresión basal del biomarcador. Estos valores o intervalos se pueden obtener de un único paciente o de un grupo de pacientes.

5 Una cantidad absoluta de una molécula o analito en una muestra se puede expresar ventajosamente como peso o como cantidad molar, o más comúnmente como una concentración, por ejemplo, peso por volumen o mol por volumen.

10 Una cantidad relativa de una molécula o analito en una muestra se puede expresar ventajosamente como un aumento o disminución o como un aumento en veces o disminución en veces relativo a dicho otro valor, tal como relativo a un valor de referencia como se enseña en el presente documento. Realizar una comparación relativa entre una primera y segunda variables (por ejemplo, primera y segunda cantidades) puede pero no necesita requerir determinar primero los valores absolutos de dichas primera y segunda variables. Por ejemplo, un método de medida puede producir lecturas cuantificables (tal como, por ejemplo, intensidades de señal) para dichas primera y segunda variables, en donde dichas lecturas son una función del valor de dichas variables, y en donde dichas lecturas se pueden comparar directamente para producir un valor relativo de la primera variable frente a la segunda variable, sin la necesidad real de convertir primero las lecturas a valores absolutos de las respectivas variables.

20 Como se usa en el presente documento, la referencia a cualquier biomarcador, ácido nucleico, proteína, polipéptido o péptido corresponde al biomarcador, ácido nucleico, proteína, polipéptido o péptido comúnmente conocido bajo las designaciones respectivas en la técnica. Los términos abarcan tales biomarcadores, ácidos nucleicos, proteínas, polipéptidos o péptidos de cualquier organismo donde se encuentran, y particularmente de animales, preferiblemente animales de sangre caliente, más preferiblemente vertebrados, aún más preferiblemente mamíferos, incluyendo humanos y mamíferos no humanos, incluso más preferiblemente de seres humanos. Los términos particularmente abarcan tales biomarcadores, ácidos nucleicos, proteínas, polipéptidos o péptidos con una secuencia nativa, es decir, cuya secuencia primaria es la misma que la de los biomarcadores, ácidos nucleicos, proteínas, polipéptidos o péptidos encontrados en o derivados de la naturaleza. Un experto en la materia entiende que las secuencias nativas pueden ser diferentes entre diferentes especies debido a la divergencia genética entre tales especies. Además, las secuencias nativas se pueden diferenciar entre o en diferentes individuos de la misma especie debido a diversidad genética normal (variación) en una especie determinada. Además, las secuencias nativas se pueden diferenciar entre o incluso en diferentes individuos de la misma especie debido a variaciones postranscripcionales o postraduccionales. Cualquiera de tales variantes o isoformas de los biomarcadores, ácidos nucleicos, proteínas, polipéptidos o péptidos se pretenden en el presente documento. Según esto, todas las secuencias de biomarcadores, ácidos nucleicos, proteínas, polipéptidos o péptidos encontradas en o derivadas de la naturaleza se consideran "nativas". Los términos abarcan los biomarcadores, ácidos nucleicos, proteínas, polipéptidos o péptidos cuando forman parte de un organismo vivo, órgano, tejido, o célula, cuando forman parte de una muestra biológica, así como cuando están al menos parcialmente aislados de tales fuentes. Los términos también abarcan los biomarcadores, ácidos nucleicos, proteínas, polipéptidos o péptidos cuando se producen por medios recombinantes o sintéticos.

40 Los biomarcadores, ácidos nucleicos, proteínas, polipéptidos o péptidos humanos ejemplares como se enseña en la presente invención pueden estar anotados con los números de acceso de Genbank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) que se dan a continuación. Un experto en la materia también puede apreciar que en algunos casos dichas secuencias pueden ser de precursores (por ejemplo, preproteínas) de los biomarcadores, ácidos nucleicos, proteínas, polipéptidos o péptidos como se enseña en el presente documento y pueden incluir partes que se procesan eliminándose de los biomarcadores, ácidos nucleicos, proteínas, polipéptidos o péptidos maduros. Un experto en la materia también puede apreciar que aunque solo una o más isoformas pueden estar enumeradas a continuación, se pretenden todas las isoformas. A menos que se especifique de otra manera, las entradas posteriores se presentan en la forma: Nombre (código, número de acceso de Genbank para una o más secuencias de ARNm representativas (por ejemplo, isoformas), seguido por un punto y la versión de la secuencia de Genbank; número de acceso de Genbank para una o más secuencias de aminoácidos representativas correspondientes (por ejemplo, isoformas), seguidas por un punto y la versión de la secuencia de Genbank):

55 Factor derivado del estroma 1 e isoformas α , β , γ , ϕ y ϵ (SDF-1 o CXCL12; NM_199168.3, NM_000609.5, NM_001033886.2, NM_001178134.1; NP_954637.1, NP_000600.1, NP_001029058.1, Nip_001171605.1)

Factor de crecimiento derivado de plaquetas BB, es decir, un homodímero de polipéptidos PDGFB beta (PDGFB; NM_002608.2, NM_033016.2; NP_002599.1, NP_148937.1)

60 Interlequina-8 (IL-8, CXCL8, GCP-1, LECT, LUCT, LYNAP, MDNCF, MONAP, NAF, NAP-1 o NAP1; NM_000584.2; NP_000575.1)

Interlequina-6 (IL-6, HSF, HGF, CDF, BSF2 o IFNB2; NM_000600.3, Nip_000591.1)

65 Preferiblemente, cuando la muestra es sangre completa o un componente fraccional de la misma tal como plasma o suero, cualquier biomarcador, ácido nucleico, proteína, polipéptido o péptido puede ser una forma circulante (es decir, una forma no unida a célula o membrana).

A menos que sea de otra forma aparente del contexto, la referencia en el presente documento a cualquier biomarcador, ácido nucleico, proteína, polipéptido o péptido del mismo generalmente también puede abarcar formas modificadas de dicho biomarcador, ácido nucleico, proteína, polipéptido o péptido tal como que lleva modificaciones posexpresión incluyendo, por ejemplo, fosforilación, glucosilación, lipidación, metilación, cisteinilización, sulfonación, glutationilación, acetilación, oxidación de metionina a sulfoxido de metionina o sulfona de metionina, y similares.

En una forma de realización, cualquier biomarcador, ácido nucleico, proteína, polipéptido o péptido puede ser humano, es decir, su secuencia primaria puede ser la misma que una secuencia primaria correspondiente de o presente en un biomarcador, ácido nucleico, proteína, polipéptido o péptido humano natural. Por tanto, el calificador "humano" a este respecto se refiere a la secuencia primaria del respectivo biomarcador, ácido nucleico, proteína, polipéptido o péptido, más que a su origen o fuente. Por ejemplo, tal biomarcador, ácido nucleico, proteína, polipéptido o péptido puede estar presente en o aislado de muestras de sujetos humanos o se puede obtener por otros medios (por ejemplo, por expresión recombinante, traducción sin células o síntesis de péptidos no biológica).

Preferiblemente, los biomarcadores como se pretende en el presente documento están basados en proteína, polipéptido o péptido.

La referencia en el presente documento a cualquier biomarcador, ácido nucleico, proteína, polipéptido o péptido también puede abarcar fragmentos de los mismos. Por tanto, la referencia en el presente documento a medir (o medir la cantidad de) cualquier biomarcador, ácido nucleico, proteína, polipéptido o péptido puede abarcar medir el biomarcador, ácido nucleico, proteína, polipéptido o péptido y/o medir uno o más fragmentos de los mismos. Por ejemplo, cualquier biomarcador, ácido nucleico, proteína, polipéptido o péptido y/o uno o más fragmentos de los mismos se pueden medir colectivamente, de modo que la cantidad medida se corresponda a la suma de las cantidades de las especies medidas colectivamente. En otro ejemplo, cualquier biomarcador, ácido nucleico, proteína, polipéptido o péptido y/o uno o más fragmentos de los mismos se pueden medir cada uno individualmente.

El término "fragmento" de un ácido nucleico generalmente se refiere a formas 5' y/o 3' terminalmente delecionadas o truncadas de dicho ácido nucleico. El término "fragmento" de una proteína, polipéptido o péptido generalmente se refiere a formas N terminalmente y/o C terminalmente delecionadas o truncadas de dicha proteína, polipéptido o péptido. Sin limitación, un fragmento de un ácido nucleico, proteína, polipéptido o péptido puede representar al menos aproximadamente el 5%, o al menos aproximadamente el 10%, por ejemplo, $\geq 20\%$, $\geq 30\%$ o $\geq 40\%$, tal como preferiblemente $\geq 50\%$, por ejemplo, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$ o $\geq 80\%$, o más preferiblemente $\geq 90\%$ o $\geq 95\%$ de la secuencia de nucleótidos de dicho ácido nucleico o de la secuencia de aminoácidos de dicha proteína, polipéptido o péptido.

En algunas formas de realización, los biomarcadores u otros reactivos divulgados en el presente documento pueden comprender un marcador detectable. El término "marcador" se refiere a cualquier átomo, molécula, fracción o biomolécula que se puede usar para proporcionar una lectura o propiedad detectable y preferiblemente cuantificable, y que se puede unir o hacer parte de una entidad de interés, tal como un péptido o polipéptido o un agente de unión específico. Los marcadores pueden ser adecuadamente detectables por medios espectrométricos de masa, espectroscópicos, ópticos, colorimétricos, magnéticos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Los marcadores incluyen, sin limitación, tintes; radiomarcadores tal como ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{125}I , ^{131}I ; reactivos densos a los electrones; enzimas (peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina comúnmente usadas en inmunoensayos); fracciones de unión tal como biotina, maltosa; haptenos tal como digoxigenina, etiqueta his, etiqueta myc; fracciones luminogénicas, fosforescentes o fluorogénicas; etiquetas de masa; y tintes fluorescentes solos o en combinación con fracciones que pueden suprimir o cambiar espectros de emisión por transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET). Los ejemplos de asociaciones que se pueden utilizar en la organización marcador:compañero de unión pueden incluir, por ejemplo, biotina:estreptavidina, etiqueta his:ion metálico (por ejemplo, Ni^{2+}), maltosa:proteína de unión a maltosa.

También se contempla en el presente documento el uso de cualquier biomarcador, ácido nucleico, proteína, polipéptido o péptido como se enseña en el presente documento, que comprende opcionalmente un marcador detectable, como controles (positivos), estándares o calibradores en ensayos de detección cualitativa o cuantitativa (métodos de medida) de dichos biomarcadores, ácidos nucleicos, proteínas, polipéptidos o péptidos, y particularmente en tales métodos para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de enfermedades o afecciones como se enseña en el presente documento en sujetos. Los biomarcadores, ácidos nucleicos, proteínas, polipéptidos o péptidos se pueden suministrar en cualquier forma, entre otras como precipitado, secados al vacío, liofilizado, en solución como líquido o congelado, o inmovilizados de forma covalente o no covalente en fase sólida, tal como, por ejemplo, es matriz cromatográfica sólida, o en vidrio o plástico u otras superficies adecuadas (por ejemplo, como una parte de matrices o micromatrices de péptidos). Los biomarcadores, ácidos nucleicos, proteínas, polipéptidos o péptidos se pueden preparar fácilmente, por ejemplo, aislados de fuentes naturales, o preparados recombinante o sintéticamente.

Además se divulgan agentes de unión capaces de unirse específicamente a biomarcadores, ácidos nucleicos, proteínas, polipéptidos o péptidos como se enseña en el presente documento. Los agentes de unión como se pretende a lo largo de esta especificación pueden incluir, entre otros, sondas de hibridación, cebadores de

amplificación, anticuerpo, aptámero, fotoaptámero, proteína, péptido, peptidomimético o molécula pequeña. Los agentes de unión pueden estar marcados adecuadamente.

El término “se une específicamente” como se usa a lo largo de esta especificación significa que un agente (indicado en el presente documento también como “agente de unión específica”) se une a una o más moléculas o analitos deseados sustancialmente hasta la exclusión de otras moléculas que son aleatorias o no relacionadas, y opcionalmente sustancialmente hasta la exclusión de otras moléculas que están estructuralmente relacionadas. El término “se une específicamente” no requiere necesariamente que un agente se una exclusivamente a su(s) diana(s) pretendida(s). Por ejemplo, se puede decir que se une específicamente a su(s) diana(s) de interés si su afinidad por tales diana(s) pretendida(s) en las condiciones de unión es al menos aproximadamente 2 veces mayor, preferiblemente al menos aproximadamente 5 veces mayor, más preferiblemente al menos aproximadamente 10 veces mayor, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 25 veces mayor, todavía más preferiblemente al menos 50 veces mayor, e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 100 veces mayor, que su afinidad por una molécula no diana. Para sondas de hibridación, la unión específica se puede evaluar en condiciones de hibridación de alta rigurosidad como se sabe en la técnica. Para cebadores de amplificación, la unión específica se puede evidenciar por amplificación selectiva de la diana pretendida.

Preferiblemente, el agente se puede unir a su(s) diana(s) pretendida(s) con una constante de afinidad (K_A) de tal unión $K_A \geq 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, más preferiblemente $K_A \geq 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, aún más preferiblemente $K_A \geq 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, incluso más preferiblemente $K_A \geq 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, y todavía más preferiblemente $K_A \geq 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ o $K_A \geq 1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, en donde $K_A = [\text{SBA}_T]/[\text{SBA}][T]$, SBA indica el agente de unión específico, T indica la diana pretendida. La determinación de K_A se puede llevar a cabo por métodos conocidos en la técnica, tal como, por ejemplo, usando diálisis en equilibrio y análisis de gráficos de Scatchard.

Como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” se usa en su sentido más amplio y generalmente se refiere a cualquier agente de unión inmunológico. El término específicamente abarca anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes (por ejemplo, 2, 3 o más valente) y/o multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos bi- o más específicos) formados de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos en tanto que muestren la actividad biológica deseada (particularmente, capacidad de unirse específicamente a un antígeno de interés), así como compuestos multivalentes y/o multiespecíficos de tales fragmentos. El término “anticuerpo” no solo es inclusivo de anticuerpos generados por métodos que comprenden inmunización, sino que también incluye cualquier polipéptido, por ejemplo, un polipéptido expresado recombinantemente, que se hace para abarcar al menos una región determinante de complementariedad (CDR) capaz de unirse específicamente a un epítipo o antígeno de interés. Por tanto, el término se aplica a tales moléculas independientemente de si se producen in vitro o in vivo.

Un anticuerpo puede ser cualquiera de las clases IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y preferiblemente anticuerpo de clase IgG. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, por ejemplo, un antisero o inmunoglobulinas purificadas del mismo (por ejemplo, purificadas por afinidad). Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o una mezcla de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden dirigir a un antígeno particular o un epítipo particular en un antígeno con mayor selectividad y reproducibilidad. A modo de ejemplo y no limitación, los anticuerpos monoclonales se pueden hacer por el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al. 1975 (Nature 256: 495), o se pueden hacer por métodos de ADN recombinante (por ejemplo, como en el documento US 4.816.567). Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar de genotecas de anticuerpos en fagos usando técnicas como las descritas por Clackson et al. 1991 (Nature 352: 624-628) y Marks et al. 1991 (J Mol Biol 222: 581-597), por ejemplo.

Los agentes de unión de anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpos. Los “fragmentos de anticuerpo” comprenden una parte de un anticuerpo intacto, que comprende la región de unión al antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y scFv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única; y anticuerpos multivalentes y/o multiespecíficos formados de fragmento(s) de anticuerpo; por ejemplo, dicuerpos, tricuerpos, y multicuerpos. Las anteriores designaciones Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, etc., se pretende que tengan su significado establecido en la técnica.

El término anticuerpo incluye anticuerpos que se originan de o comprenden una o más partes derivadas de cualquier especie animal, preferiblemente especies de vertebrados, incluyendo, por ejemplo, aves y mamíferos. Sin limitación, los anticuerpos pueden ser de pollo, pavo, ganso, pato, pintada, codorniz o faisán. También sin limitación, los anticuerpos pueden ser humanos, murinos (por ejemplo, de ratón, rata, etc.), burro, conejo, cabra, oveja, cobaya, camello (por ejemplo, *Camelus bactrianus* y *Camelus dromaderius*), llama (por ejemplo, *Lama paccos*, *Lama glama* o *Lama vicugna*) o caballo.

Un experto en la materia entenderá que un anticuerpo puede incluir una o más delecciones, adiciones y/o sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras) de aminoácidos, en tanto que tales alteraciones conserven su unión al antígeno respectivo. Un anticuerpo también puede incluir una o más modificaciones nativas o artificiales de sus residuos de aminoácidos constituyentes (por ejemplo, glucosilación, etc.).

Los métodos de producir anticuerpos policlonales y monoclonales así como fragmentos de los mismos se conocen bien en la técnica, como lo son los métodos para producir anticuerpos recombinantes o fragmentos de los mismos (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Laboratory, Nueva York, 1988; Harlow y Lane, "Using Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Laboratory, Nueva York, 1999, ISBN 0879695447; "Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques", por Zola, ed., CRC Press 1987, ISBN 0849364760; "Monoclonal Antibodies: A Practical Approach", por Dean & Shepherd, eds., Oxford University Press 2000, ISBN 0199637229; Methods in Molecular Biology, vol. 248: "Antibody Engineering: Methods and Protocols", Lo, ed., Humana Press 2004, ISBN 1588290921).

El término "aptámero" se refiere a oligo-ADN, oligo-ARN u oligo-ADN/ARN monocatenario o bicatenario o cualquier análogo de los mismos, que se puede unir específicamente a una molécula diana tal como un péptido. Ventajosamente, los aptámeros pueden mostrar especificidad y afinidad bastante alta (por ejemplo, K_A en el orden de $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) para sus dianas. La producción de aptámeros se describe, entre otros en el documento US 5.270.163; Ellington & Szostak 1990 (Nature 346: 818-822); Tuerk & Gold 1990 (Science 249: 505-510); o "The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications", por Klussmann, ed., Wiley-VCH 2006, ISBN 3527310592, incorporados mediante referencia en el presente documento. El término "fotoaptámero" se refiere a un aptámero que contiene uno o más grupos funcionales fotorreactivos que se pueden unir covalentemente a o entrecruzar con una molécula diana. El término "peptidomimético" se refiere a un agente no peptídico que es un análogo topológico de un péptido correspondiente. Se conocen en la técnica métodos de diseñar racionalmente peptidomiméticos. Por ejemplo, el diseño racional de tres peptidomiméticos basados en el péptido 8-mero sulfatado CCK26-33, y de dos peptidomiméticos basados en el péptido 11-mero sustancia P, y principios de diseño de peptidomiméticos relacionados, se describen en, Horwell 1995 (Trends Biotechnol 13: 132-134).

El término "molécula pequeña" se refiere a compuestos, preferiblemente compuestos orgánicos, con un tamaño comparable a esas moléculas orgánicas generalmente usadas en fármacos. El término excluye macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas preferidas varían en tamaño hasta aproximadamente 5000 Da, por ejemplo, hasta aproximadamente 4000, preferiblemente hasta 3000 Da, más preferiblemente hasta 2000 Da, incluso más preferiblemente hasta aproximadamente 1000 Da, por ejemplo, hasta aproximadamente 900, 800, 700, 600 o hasta 500 Da.

Cualquier método de separación, detección y cuantificación existente, disponible o convencional se puede usar en el presente documento para medir la presencia o ausencia (por ejemplo, lectura estar presente frente a ausente; o cantidad detectable frente a cantidad indetectable) y/o cantidad (por ejemplo, la lectura es una cantidad absoluta o relativa, tal como, por ejemplo, concentración absoluta o relativa) de biomarcadores, ácidos nucleicos, proteínas, polipéptidos o péptidos de los mismos en muestras (cualquier molécula o analito de interés que se va a medir así en muestras, incluyendo uno cualquiera o más de biomarcadores, ácidos nucleicos, proteínas, polipéptidos o péptidos como se enseña en el presente documento, se puede denominar posteriormente en el presente documento colectivamente como biomarcadores).

Por ejemplo, tales métodos pueden incluir métodos de ensayo bioquímico, métodos de inmunoensayos, métodos de análisis de espectrometría de masas, o métodos de cromatografía, o combinaciones de los mismos.

El término "inmunoensayo" generalmente se refiere a métodos conocidos como tal para detectar una o más moléculas o analitos de interés en una muestra, en donde la especificidad de un inmunoensayo para la(s) molécula(s) o analito(s) de interés está conferida por la unión específica entre un agente de unión específico, comúnmente un anticuerpo, y la(s) molécula(s) o analito(s) de interés. Las tecnologías de inmunoensayos incluyen sin limitación ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción) directo, ELISA indirecto, ELISA sándwich, ELISA competitivo, ELISA multiplex, radioinmunoensayo (RIA), tecnologías de ELISPOT y otros métodos similares conocidos en la técnica. Los principios de estos métodos de inmunoensayo se conocen en la técnica, por ejemplo, John R. Crowther, "The ELISA Guidebook", 1ª ed., Humana Press 2000, ISBN 0896037282.

A modo de explicación adicional y no limitación, el ELISA directo emplea un anticuerpo primario marcado para unirse a y mediante ello cuantificar antígeno diana en una muestra inmovilizada en un soporte sólida tal como una placa de micropocillos. El ELISA indirecto usa un anticuerpo primario no marcado que se une al antígeno diana y un anticuerpo secundario marcado que reconoce y permite cuantificar el anticuerpo primario unido al antígeno. En el ELISA sándwich el antígeno diana se captura de una muestra usando un anticuerpo de 'captura' inmovilizado que se une a un sitio antigénico en el antígeno, y posterior a la eliminación de los analitos no unidos el antígeno así capturado se detecta usando un anticuerpo de 'detección' que se une a otro sitio antigénico en dicho antígeno, donde el anticuerpo de detección se puede marcar directamente o ser indirectamente detectable como anteriormente. El ELISA competitivo usa un 'competidor' marcado que puede ser bien el anticuerpo primario o el antígeno diana. En un ejemplo, el anticuerpo primario inmovilizado no marcado se incubaba con una muestra, esta reacción se deja alcanzar el equilibrio, y después se añade antígeno marcado. El último se unirá al anticuerpo primario siempre que sus sitios de unión no estén ya ocupados por antígeno diana no marcado en la muestra. Por tanto, la cantidad detectada de antígeno marcado unido se correlaciona inversamente con la cantidad de antígeno no marcado en la muestra. El ELISA multiplex permite la detección simultánea de dos o más analitos en un único compartimento (por ejemplo, pocillo de microplaca) habitualmente en una pluralidad de coordenadas de la matriz

(véase, por ejemplo, Nielsen & Geierstanger 2004. J Immunol Methods 290: 107-20 y Ling et al. 2007. Expert Rev Mol Diagn 7: 87-98, para orientación adicional). Como se aprecia, el marcaje en las tecnologías de ELISA es habitualmente mediante conjugación de enzimas (tal como, por ejemplo, peroxidasa de rábano) y el criterio de valoración es típicamente colorimétrico, quimioluminiscente o fluorescente, magnético, piezoeléctrico, piroeléctrico y otros.

El radioinmunoensayo (RIA) es una técnica basada en competición e implica mezclar cantidades conocidas de antígeno diana radioactivamente marcado (por ejemplo, marcado con ^{125}I o ^{131}I) con anticuerpo hacia dicho antígeno, después añadir antígeno no marcado o 'frío' de una muestra y medir la cantidad de antígeno marcado desplazado (véase, por ejemplo, "An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques", por Chard T, ed., Elsevier Science 1995, ISBN 0444821198 para orientación).

Generalmente, cualquier técnica de espectrometría de masas (MS) que pueda obtener información precisa sobre la masa de péptidos, y preferiblemente también sobre fragmentación y/o secuencia de aminoácidos (parcial) de péptidos seleccionados (por ejemplo, en espectrometría de masas en tándem, MS/MS; o en decaimiento post-fuente, TOF MS), son útiles en el presente documento. Las técnicas y sistemas de MS y MS/MS de péptidos adecuadas se conocen bien por sí (véase, por ejemplo, Methods in Molecular Biology, vol. 146: "Mass Spectrometry of Proteins and Peptides", por Chapman, ed., Humana Press 2000, ISBN 089603609x; Biemann 1990. Methods Enzymol 193: 455-79; o Methods in Enzymology, vol. 402: "Biological Mass Spectrometry", por Burlingame, ed., Academic Press 2005, ISBN 9780121828073) y se pueden usar en el presente documento. La fragmentación iónica de péptidos en organizaciones de MS de tándem (MS/MS) se puede alcanzar usando modos establecidos en la técnica, tal como disociación inducida por colisión (CID). La detección y cuantificación de los biomarcadores por espectrometría de masas puede implicar seguimiento múltiple de reacciones (MRM), tal como han descrito entre otros, Kuhn et al. 2004 (Proteomics 4: 1175-86). Los métodos de análisis de péptidos por MS se pueden combinar ventajosamente con métodos de separación o fraccionamiento anterior de péptidos o proteínas, tal como por ejemplo con métodos cromatográficos.

También se puede usar cromatografía para medir biomarcadores. Como se usa en el presente documento, el término "cromatografía" abarca métodos para separar sustancias químicas, denominado como tal y ampliamente disponible en la técnica. En un enfoque preferido, cromatografía se refiere a un proceso en el que una mezcla de sustancias químicas (analitos) llevados por una corriente en movimiento de líquido o gas ("fase móvil") se separa en componentes como resultado de la distribución diferencial de los analitos, según fluyen alrededor o sobre una fase estacionaria líquida o sólida ("fase estacionaria"), entre dicha fase móvil y dicha fase estacionaria. La fase estacionaria puede ser habitualmente un sólido finamente dividido, una lámina de material de filtro, o una película fina de un líquido en la superficie de un sólido, o similar. La cromatografía también es ampliamente aplicable para la separación de compuestos químicos de origen biológico, tal como, por ejemplo, aminoácidos, proteínas, fragmentos de proteínas o péptidos, etc.

La cromatografía como se usa en el presente documento, puede ser preferiblemente en columna (es decir, en donde la fase estacionaria se deposita o empaqueta en una columna), preferiblemente cromatografía líquida, y aún más preferiblemente HPLC. Mientras que los particulares de la cromatografía se conocen bien en la técnica, para orientación adicional véase, por ejemplo, Meyer M., 1998, ISBN: 047198373X, y "Practical HPLC Methodology and Applications", Bidlingmeyer, B. A., John Wiley & Sons Inc., 1993. Los tipos ejemplares de cromatografía incluyen, sin limitación, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), HPLC de fase normal (NP-HPLC), HPLC de fase reversa (RP-HPLC), cromatografía de intercambio iónico (IEC), tal como cromatografía de intercambio catiónico o aniónico, cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), cromatografía de exclusión molecular (SEC), incluyendo cromatografía de filtración en gel o cromatografía de permeación en gel, cromatografía de afinidad tal como cromatografía de inmunofinidad, de afinidad de metal inmovilizado, y similares.

Se pueden usar métodos adicionales de separación, identificación o cuantificación de péptidos o polipéptidos, opcionalmente junto con cualquiera de los métodos de análisis anteriormente descritos, para medir biomarcadores en la presente divulgación. Tales métodos incluyen, sin limitación, reparto por extracción química, isoelectroenfoque (IEF) incluyendo isoelectroenfoque capilar (CIEF), isotacoforesis capilar (CITP), electrocromatografía capilar (CEC), y similares, electroforesis en gel de poli(acrilamida) unidimensional (PAGE), electroforesis en gel de poli(acrilamida) bidimensional (2D-PAGE), electroforesis en gel capilar (CGE), electroforesis en zona capilar (CZE), cromatografía electrocinética micelar (MEKC), electroforesis de flujo libre (FFE), etc.

El nivel de biomarcadores a nivel de ARN se puede detectar usando herramientas de medidas de ARN cuantitativas estándar conocidas en la técnica. Los ejemplos no limitantes incluyen análisis basados en hibridación, análisis de expresión en micromatrices, expresión génica digital (DGE), hibridación in situ de ARN (RISH), análisis de transferencia Northern y similares; PCR, RT-PCR, RT qPCR, PCR de punto final, PCR digital, o similares; detección de oligonucleótidos soportada, pirosecuenciación, secuenciación cíclica polony por síntesis, secuenciación bidireccional simultánea, secuenciación de molécula única, secuenciación en tiempo real de molécula única, secuenciación de molécula única verdadera, secuenciación de nanoporo asistida por hibridación y secuenciación por síntesis.

Los varios aspectos y formas de realización enseñados en el presente documento se puede basar además en comparar la cantidad de biomarcadores medidos en muestras de pacientes con valores de referencia, en donde dichos valores de referencia representan predicciones, diagnósticos y/o pronósticos conocidos de enfermedades o afecciones como se enseña en el presente documento.

Por ejemplo, distintos valores de referencia pueden representar la predicción de riesgo (por ejemplo, un riesgo anormalmente elevado) de tener una enfermedad o afección determinada como se enseña en el presente documento frente a la predicción de riesgo nulo o normal de tener dicha enfermedad o afección. En otro ejemplo, distintos valores de referencia pueden representar predicciones de grados diferentes de riesgo de tener tal enfermedad o afección.

En un ejemplo adicional, distintos valores de referencia pueden representar el diagnóstico de una enfermedad o afección determinada como se enseña en el presente documento frente al diagnóstico de no tal enfermedad o afección (tal como, por ejemplo, el diagnóstico de sano, o recuperado de dicha enfermedad o afección, etc.). En otro ejemplo, distintos valores de referencia pueden representar el diagnóstico para tal enfermedad o afección de gravedad variable.

En aún otro ejemplo, distintos valores de referencia pueden representar un buen pronóstico para una enfermedad o afección determinada como se enseña en el presente documento frente a un mal pronóstico para dicha enfermedad o afección. En un ejemplo adicional, distintos valores de referencia pueden representar pronósticos variablemente favorables o desfavorables para tal enfermedad o afección.

Tal comparación puede generalmente incluir cualquier medio para determinar la presencia o ausencia de al menos una diferencia y opcionalmente del tamaño de tal diferencia entre valores que se comparan. Una comparación puede incluir una inspección visual, una comparación aritmética o estadística de medidas. Tales comparaciones estadísticas incluyen, pero no están limitadas a, aplicar una regla.

Se pueden establecer valores de referencia según procedimientos conocidos previamente empleados para otros biomarcadores y parámetros. Por ejemplo, se puede establecer un valor de referencia en un individuo o una población de individuos caracterizado por un diagnóstico, predicción y/o pronóstico particular de dicha enfermedad o afección (es decir, para quien dicho diagnóstico, predicción o pronóstico de la enfermedad o afección se mantiene cierta). Tal población puede comprender sin limitaciones ≥ 2 , ≥ 100 , o incluso varios cientos o más de individuos.

Una “desviación” de un primer valor de un segundo valor generalmente puede abarcar cualquier dirección (por ejemplo, aumento; primer valor > segundo valor; o disminución: primer valor < segundo valor) y cualquier grado de alteración.

Por ejemplo, una desviación puede abarcar una disminución de un primer valor en, sin limitación, al menos aproximadamente el 10% (aproximadamente 0,9 veces o menos), o en al menos aproximadamente el 20% (aproximadamente 0,8 veces o menos), o en al menos aproximadamente el 30% (aproximadamente 0,7 veces o menos), o en al menos aproximadamente el 40% (aproximadamente 0,6 veces o menos), o en al menos aproximadamente el 50% (aproximadamente 0,5 veces o menos), o en al menos aproximadamente el 60% (aproximadamente 0,4 veces o menos), o en al menos aproximadamente el 70% (aproximadamente 0,3 veces o menos), o en al menos aproximadamente el 80% (aproximadamente 0,2 veces o menos), o en al menos aproximadamente el 90% (aproximadamente 0,1 veces o menos), relativo a un segundo valor con el que se hace una comparación.

Por ejemplo, una desviación puede abarcar un aumento de un primer valor en, sin limitación, al menos aproximadamente el 10% (aproximadamente 1,1 veces o más), o en al menos aproximadamente el 20% (aproximadamente 1,2 veces o más), o en al menos aproximadamente el 30% (aproximadamente 1,3 veces o más), o en al menos aproximadamente el 40% (aproximadamente 1,4 veces o más), o en al menos aproximadamente el 50% (aproximadamente 1,5 veces o más), o en al menos aproximadamente el 60% (aproximadamente 1,6 veces o más), o en al menos aproximadamente el 70% (aproximadamente 1,7 veces o más), o en al menos aproximadamente el 80% (aproximadamente 1,8 veces o más), o en al menos aproximadamente el 90% (aproximadamente 1,9 veces o más), o en al menos aproximadamente el 100% (aproximadamente 2 veces o más), o en al menos aproximadamente el 150% (aproximadamente 2,5 veces o más), o en al menos aproximadamente el 200% (aproximadamente 3 veces o más), o en al menos aproximadamente el 500% (aproximadamente 6 veces o más), o en al menos aproximadamente el 700% (aproximadamente 8 veces o más), o similar, relativo a un segundo valor con el que se hace una comparación.

Preferiblemente, una desviación se puede referir a una alteración estadísticamente significativa observada. Por ejemplo, una desviación se puede referir a una alteración observada que está fuera de los márgenes de error de valores de referencia en una población determinada (expresado, por ejemplo, por desviación estándar o error estándar, o por un múltiplo predeterminado de los mismos, por ejemplo, $\pm 1 \times DE$ o $\pm 2 \times DE$, o $\pm 1 \times EE$, o $\pm 2 \times EE$). Desviación también se puede referir a un valor que está fuera de un intervalo de referencia definido por valores en

una población determinada (por ejemplo, fuera de un intervalo que comprende $\geq 40\%$, $\geq 50\%$, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 75\%$ o $\geq 80\%$ o $\geq 85\%$ o $\geq 90\%$, o $\geq 95\%$ o incluso $\geq 100\%$ de valores de dicha población).

En una forma de realización adicional, se puede concluir una desviación si una alteración observada está más allá de un umbral o valor de corte determinado. Tal umbral o valor de corte se puede seleccionar como generalmente se sabe en la técnica para proporcionar una sensibilidad y/o una especificidad elegida de los métodos diagnósticos, de predicción y/o pronósticos, por ejemplo, sensibilidad y/o especificidad del al menos el 50%, o al menos el 60%, o al menos el 70%, o al menos el 80%, o al menos el 85% o al menos el 90% o al menos el 95%.

Por tanto hace aparente que se han proporcionado según la invención, biomarcadores, usos y métodos que proporcionan ventajas sustanciales en el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura alterada. Mientras que la invención se ha descrito junto con formas de realización específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán aparentes para los expertos en la materia a la luz de la descripción anterior. Según esto, se pretende abarcar todas de tales alternativas, modificaciones y variaciones como sigue en el espíritu y amplio ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

Los aspectos y formas de realización de la invención están apoyados además por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Medida de los niveles de biomarcador en suero/plasma

Dos grupos de sujetos entraron en el estudio: (1) voluntarios sanos (VS), (2) pacientes con consolidación de fractura alterada, en particular con fracturas con pseudoarticulaciones (SA). La población de pacientes se distribuyó como sigue:

	Voluntarios sanos (VS)	Pseudoarticulación (SA)	P
Número de sujetos	79	20	
Edad mediana (años $\pm$ DE)	32 $\pm$ 10	43 $\pm$ 16	0,012
Sexo (%) Mujeres	67	20	
Sitio de fractura	-	Huesos largos	
Retraso (meses $\pm$ DE)	-	25 $\pm$ 15	

La edad mediana en los dos grupos varió entre treinta y cuarenta años de edad. Los pacientes de pseudoarticulación eran mayores ($P = 0,012$) y eran mayoritariamente hombres. Sin embargo, los resultados permanecieron sin cambiar independientemente del sexo y la edad. Los sitios de los huesos eran en huesos largos (radio, húmero, peroné, tibia y cúbito) excepto 2 fracturas del metatarso y 2 fracturas de calcáneo. El retraso entre la fractura y la recogida de la muestra varió aproximadamente 25 meses con una desviación estándar de 15 meses.

Para identificar los marcadores biológicos sistémicos de pseudoarticulaciones, se recogieron sueros en tubos secos y se recogió plasma en tubos con heparina o EDTA, se centrifugó, hicieron alícuotas y congeló a -20°C hasta su uso. Estas se usaron para determinar el nivel de factores de crecimiento y proteína usando enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA).

El factor derivado del estroma uno se midió en plasma (SDF-1/CXCL12, Duoset, R&D Systems, Abingdon, Reino Unido). Los siguientes biomarcadores se midieron en el suero: factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB, Quantikine™, R&D Systems, Abingdon, Reino Unido), interleuquina-8 (IL8/CXCL8, Quantikine™, R&D Systems, Abingdon, Reino Unido) e interleuquina 6 (IL-6, Quantikine™, R&D Systems, Abingdon, Reino Unido).

Todos los valores continuos se expresan como medianas $\pm$ error estándar de la media (EEM), todos los valores descritos de P son unilaterales, y la significación estadística se evalúa en el nivel del 10%. La normalidad de la distribución se probó con una prueba de Kolmogorov-Smirnov. Cuando la prueba de Kolmogorov-Smirnov falló, las diferencias entre grupos se analizaron por una prueba de Mann-Whitney.

Cuando se compara con los VS, en pacientes de SA, el nivel en plasma de SDF-1 estaba disminuido (Fig. 1A). La disminución era más pronunciada en plasma recogido en tubos con heparina comparado con el plasma recogido en tubos con EDTA (Fig. 1B y 1C). Por tanto, la heparina puede ser un agente de recogida de sangre preferido, específicamente un agente anticoagulante, para recoger muestras de sangre o plasma para la medida de SDF-1. Basado en el examen cuidadoso de este ejemplo particular, y a modo de ilustración solo y sin ninguna limitación a la invención como se divulga en sentido general en el presente documento, una cantidad de SDF-1 en plasma de un sujeto humano recogida usando heparina, cantidad de es menor de aproximadamente 200 pg/ml, preferiblemente menor de aproximadamente 150 pg/ml, más preferiblemente menor de aproximadamente 100 pg/ml, tal como entre aproximadamente 20 y aproximadamente 150 pg/ml o entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 pg/ml puede indicar que el sujeto tiene consolidación de fractura alterada o está en riesgo de tener consolidación de

fractura alterada o puede indicar un mal pronóstico para consolidación de fractura alterada en el sujeto, y puede indicar que el sujeto necesita un tratamiento terapéutico o profiláctico de consolidación de fractura alterada; y una cantidad de SDF-1 en plasma de un sujeto humano recogida usando heparina, cantidad que es más de aproximadamente 200 pg/ml puede indicar que el sujeto no tiene consolidación de fractura alterada o no está en riesgo de tener consolidación de fractura alterada o puede indicar un buen pronóstico para consolidación de fractura alterada en el sujeto, y puede indicar que el sujeto no necesita un tratamiento terapéutico o profiláctico de consolidación de fractura alterada.

El nivel en suero de PDGF-BB estaba disminuido en pacientes de SA cuando se compara con los controles sanos (VS) (Fig. 2). Basado en el examen cuidadoso de este ejemplo particular, y a modo de ilustración solo y sin ninguna limitación a la invención como se divulga en sentido general en el presente documento, una cantidad de PDGF-BB en el suero de un sujeto humano que es menor de aproximadamente 2,50 ng/ml, preferiblemente menor de aproximadamente 2,25 ng/ml, más preferiblemente es aproximadamente 2,00 ng/ml o menor, tal como entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 2,5 ng/ml o entre aproximadamente 1,75 y aproximadamente 2,25 ng/ml puede indicar que el sujeto tiene consolidación de fractura alterada o está en riesgo de tener consolidación de fractura alterada o puede indicar un mal pronóstico para consolidación de fractura alterada en el sujeto, y puede indicar que el sujeto necesita un tratamiento terapéutico o profiláctico de consolidación de fractura alterada; y una cantidad de PDGF-BB en el suero de un sujeto humano, que es mayor de aproximadamente 2,50 ng/ml, preferiblemente más de aproximadamente 2,70 ng/ml, tal como entre aproximadamente 2,50 y aproximadamente 3,00 ng/ml puede indicar que el sujeto no tiene consolidación de fractura alterada o no está en riesgo de tener consolidación de fractura alterada o puede indicar un buen pronóstico para consolidación de fractura alterada en el sujeto, y puede indicar que el sujeto no necesita un tratamiento terapéutico o profiláctico de consolidación de fractura alterada.

Cuando se compara con voluntarios sanos (VS), el nivel en suero de IL-8 estaba aumentado en pacientes de SA (Fig. 3). Basado en el examen cuidadoso de este ejemplo particular, y a modo de ilustración solo y sin ninguna limitación a la invención como se divulga en sentido general en el presente documento, una cantidad de IL-8 en el suero de un sujeto humano que es más de aproximadamente 15 pg/ml, preferiblemente más de aproximadamente 20 pg/ml, más preferiblemente más de aproximadamente 25 pg/ml, incluso más preferiblemente más de aproximadamente 30 pg/ml, tal como entre aproximadamente 15 y aproximadamente 45 pg/ml o entre aproximadamente 20 y aproximadamente 40 pg/ml o entre aproximadamente 30 y aproximadamente 35 pg/ml puede indicar que el sujeto tiene consolidación de fractura alterada o está en riesgo de tener consolidación de fractura alterada o puede indicar un mal pronóstico para consolidación de fractura alterada en el sujeto, y puede indicar que el sujeto necesita un tratamiento terapéutico o profiláctico de consolidación de fractura alterada; y una cantidad de IL-8 en el suero de un sujeto humano que es menor de aproximadamente 15 pg/ml, preferiblemente menor de aproximadamente 12,5 pg/ml, tal como entre aproximadamente 5 y aproximadamente 15 pg/ml o entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 12,5 pg/ml o es aproximadamente 10 pg/ml puede indicar que el sujeto no tiene consolidación de fractura alterada o no está en riesgo de tener consolidación de fractura alterada o puede indicar un buen pronóstico para consolidación de fractura alterada en el sujeto, y puede indicar que el sujeto no necesita un tratamiento terapéutico o profiláctico de consolidación de fractura alterada.

Cuando se compara con voluntarios sanos (VS), el nivel en suero de IL-6 tendía a estar aumentado en pacientes de SA (Fig. 4A y 4B). Basado en el examen cuidadoso de este ejemplo particular, y a modo de ilustración solo y sin ninguna limitación a la invención como se divulga en sentido general en el presente documento, una cantidad de IL-6 en el suero de un sujeto humano que es más de aproximadamente 1,0 pg/ml, preferiblemente más de aproximadamente 1,2 pg/ml, más preferiblemente más de aproximadamente 1,5 pg/ml, incluso más preferiblemente más de aproximadamente 2 pg/ml, tal como entre aproximadamente 1,3 y aproximadamente 2,5 pg/ml o entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 2,5 pg/ml puede indicar que el sujeto tiene consolidación de fractura alterada o está en riesgo de tener consolidación de fractura alterada o puede indicar un mal pronóstico para consolidación de fractura alterada en el sujeto, y puede indicar que el sujeto necesita un tratamiento terapéutico o profiláctico de consolidación de fractura alterada; y una cantidad de IL-6 en el suero de un sujeto humano que es menor de aproximadamente 1,0 pg/ml puede indicar que el sujeto no tiene consolidación de fractura alterada o no está en riesgo de tener consolidación de fractura alterada o puede indicar un buen pronóstico para consolidación de fractura alterada en el sujeto, y puede indicar que el sujeto no necesita un tratamiento terapéutico o profiláctico de consolidación de fractura alterada.

Ejemplo 2: Cultivo de células de sujetos

Como se ha indicado, la cantidad de biomarcadores también se puede medir en células o en el sobrenadante de células obtenidas de sujetos y cultivadas *in vitro*, preferiblemente de células osteoblásticas (OB) o células madre mesenquimatosas (MSC). Lo siguiente proporciona protocolos adecuados para el aislamiento, diferenciación y cultivo de tales células.

Se obtuvieron de veinte a sesenta ml de médula ósea (BM) heparinizada de la cresta ilíaca distante del sitio de fractura. Se mezcló la BM con solución salina tamponada en fosfato (proporción PBS:BM (v:v): 2) y se depositó sobre una solución de Ficoll de gradiente de densidad. Después de centrifugar, se recogieron células

mononucleares de la interfase y se lavaron dos veces en PBS. Las células se sembraron a $1,43 \times 10^6$ células/botellas de 25 cm^2 en dos medios diferentes; (1) un medio mesenquimatoso compuesto de DMEM, suero bovino fetal al 10%, L-glutamina al 1%, penicilina al 1% y estreptomicina al 1%; (2) un medio osteogénico. Las células se mantuvieron en una atmósfera humidificada a 37°C que contenía CO_2 al 5%. Se hicieron cambios de medio cada 2 a 3 días. Cuando estaban confluentes, las células del cultivo primario se separaron y volvieron a sembrar para el cultivo secundario. Los sobrenadantes de estos 2 pases de cultivo se recogieron y congelaron hasta su uso.

Se aplicaron los protocolos de reactivos de ELISA usados para las muestras de sangre a los sobrenadantes celulares con adaptación rutinaria.

Ejemplo 3: Actividad autocrina/paracrina de las células osteoblásticas y células madre mesenquimatosas

Para estudiar la actividad autocrina/paracrina de las células osteoprogenitoras en consolidación de fractura ósea alterada, el nivel de factores de crecimiento secretado en el sobrenadante de cultivo de células osteoblásticas (OB) o células mesenquimatosas (MSC) se evaluó por ELISA. Se midieron los siguientes factores de crecimiento; factor derivado del estroma uno se midió en plasma (SDF-1/CXCL12, Duoset, R&D Systems, Abingdon, Reino Unido), e interleuquina 6 (IL-6, Duoset, R&D Systems, Abingdon, Reino Unido). Los valores se expresaron en pg/ml de sobrenadante.

Cuando se comparó con voluntarios sanos (VS), SDF-1 se secretaba menos en el sobrenadante de cultivo de OB y MSC de pacientes de pseudoarticulación (SA) al final del cultivo de células primario (Fig. 5A y 5B).

Además, IL-6 se secretaba menos en sobrenadante de cultivo de OB en pacientes de SA al final de los cultivos de células primario y secundario cuando se comparaba con VS (Fig. 6).

REIVINDICACIONES

1. Uso de interleuquina-8 (IL-8) como un biomarcador para consolidación de fractura ósea alterada.
- 5 2. Uso de IL-8 para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura ósea alterada.
3. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la consolidación de fractura ósea alterada se selecciona del grupo que consiste en fractura con consolidación defectuosa, fractura con consolidación retrasada y fractura sin consolidación.
- 10 4. Un método para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura ósea alterada en un sujeto que comprende medir el nivel de IL-8 en una muestra de dicho sujeto.
- 15 5. El método para el diagnóstico, predicción y/o pronóstico de consolidación de fractura ósea alterada en un sujeto según la reivindicación 4 que comprende los pasos: (i) medir la cantidad de IL-8 en una muestra del sujeto; (ii) comparar la cantidad medida en (i) con un valor de referencia que representa un diagnóstico, predicción y/o pronóstico conocido de consolidación de fractura ósea alterada; (iii) encontrar una desviación o no desviación de la cantidad medida en (i) del valor de referencia; y (iv) atribuir dicho descubrimiento de desviación o no desviación a un diagnóstico, predicción y/o pronóstico particular de consolidación de fractura ósea alterada en el sujeto.
- 20 6. El método para seguir la consolidación de fractura ósea alterada o para seguir el riesgo de desarrollar consolidación de fractura ósea alterada en un sujeto según la reivindicación 4 que comprende los pasos: (i) medir la cantidad de IL-8 en una muestra del sujeto en dos o más puntos temporales sucesivos; (ii) comparar la cantidad medida en (i) entre dichos dos o más puntos temporales sucesivos; (iii) encontrar una desviación o no desviación de la cantidad medida en (i) entre dichos dos o más puntos temporales sucesivos; (iv) atribuir dicho descubrimiento de desviación o no desviación a un cambio en la consolidación de fractura ósea alterada o a un cambio en el riesgo de desarrollar consolidación de fractura ósea alterada en el sujeto entre los dos o más puntos temporales sucesivos.
- 25 7. Un método para determinar si un sujeto está o no está en necesidad de un tratamiento terapéutico o profiláctico de consolidación de fractura ósea alterada que comprende medir el nivel de IL-8 en una muestra de dicho sujeto, que preferiblemente comprende los pasos: (i) medir la cantidad de IL-8 en la muestra del sujeto; (ii) comparar la cantidad medida en (i) con un valor de referencia que representa un diagnóstico, predicción y/o pronóstico conocido de consolidación de fractura ósea alterada; (iii) encontrar una desviación o no desviación de la cantidad medida en (i) del valor de referencia; y (iv) inferir de dicho descubrimiento la presencia o ausencia de una necesidad para un tratamiento terapéutico o profiláctico de consolidación de fractura alterada.
- 35 8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde la consolidación de fractura alterada se selecciona del grupo que consiste en fractura con consolidación defectuosa, fractura con consolidación retrasada y fractura sin consolidación.
- 40 9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, que comprende además medir el nivel de uno cualquiera o más de SDF-1, PDGF-BB, IL-6, TGF- β , PDGF, FGF y BMP en una muestra del sujeto.
- 45 10. Un método para establecer un valor de referencia para IL-8, dicho valor de referencia representa:
 - 50 (a) una predicción o diagnóstico de la ausencia de consolidación de fractura ósea alterada o un buen pronóstico para consolidación de fractura ósea alterada, o
 - (b) una predicción o diagnóstico de consolidación de fractura ósea alterada o un mal pronóstico para consolidación de fractura ósea alterada,
 - 55 que comprende
 - (i) medir la cantidad de IL-8 en una muestra de:
 - 60 (i a) uno o más sujetos que no tienen consolidación de fractura ósea alterada o no tienen riesgo de tener consolidación de fractura ósea alterada o tienen un buen pronóstico para consolidación de fractura ósea alterada, o
 - (i b) uno o más sujetos que tienen consolidación de fractura ósea alterada o que tienen riesgo de tener consolidación de fractura ósea alterada o tienen un mal pronóstico para consolidación de fractura ósea alterada, y
 - 65

- (ii a) establecer de la cantidad de IL-8 medida en (i a) el valor de referencia que representa la predicción o diagnóstico de la ausencia de consolidación de fractura ósea alterada o que representa el buen pronóstico para la consolidación de fractura ósea alterada, o
- 5 (ii b) establecer de la cantidad de IL-8 medida en (i b) el valor de referencia que representa la predicción o diagnóstico de consolidación de fractura ósea alterada o que representa el mal pronóstico para la consolidación de fractura ósea alterada.
- 10 11. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 9 o el método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, que comprende medir la cantidad sistémica de IL-8, preferiblemente en donde la muestra comprende, consiste esencialmente en o consiste en sangre completa o un componente fraccional de la misma, más preferiblemente plasma o suero.
- 15 12. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 9 o el método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, que comprende medir la cantidad de IL-8 en células o en el sobrenadante de células obtenidas del sujeto y posteriormente cultivadas *in vitro*.
- 20 13. El uso o método según la reivindicación 12, en donde las células son osteoblastos (OB) o células madre mesenquimatosas (MSC).
- 25 14. Uso de un kit para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura ósea alterada en un sujeto, el kit comprende (i) uno o más agentes de unión capaces de unirse específicamente a IL-8, particularmente en una muestra del sujeto, y (ii) opcional y preferiblemente uno o más valores de referencia o medios para establecer dichos uno o más valores de referencia, en donde dichos uno o más valores de referencia representan un diagnóstico, predicción y/o pronóstico conocido de consolidación de fractura ósea alterada.
- 30 15. El uso según la reivindicación 14, en donde los medios para recoger una muestra de un sujeto se proporcionan por separado o están comprendidos en el kit.
- 35 16. El uso de una matriz o micromatriz de ácidos nucleicos o una matriz o micromatriz de proteínas, polipéptidos o péptidos para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura ósea alterada, dicha matriz o micromatriz comprende un ácido nucleico que codifica IL-8 o comprende IL-8.
17. Uso de una matriz o micromatriz de agentes de unión para el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento de consolidación de fractura ósea alterada, dicha matriz o micromatriz comprende uno o más agentes de unión capaces de unirse específicamente a IL-8, preferiblemente comprende una cantidad o concentración conocida de dicho uno o más agentes de unión.

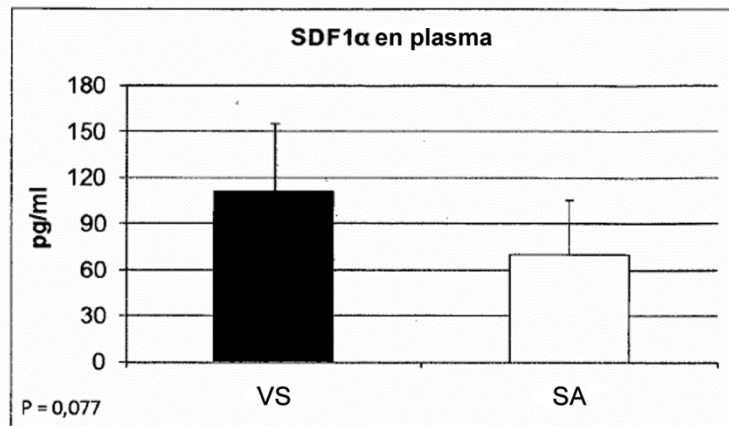


FIG 1A

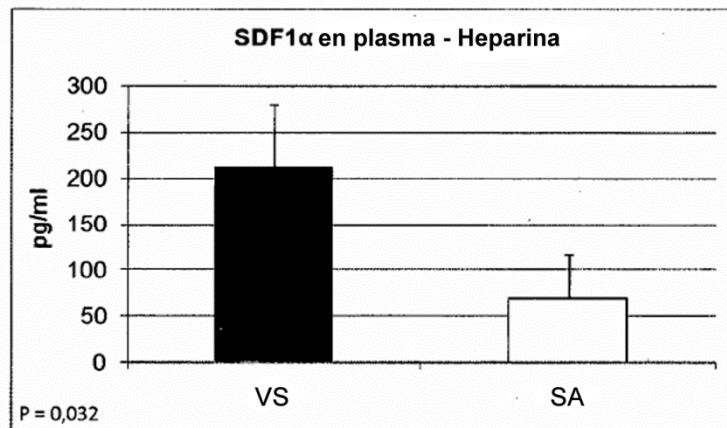


FIG 1B

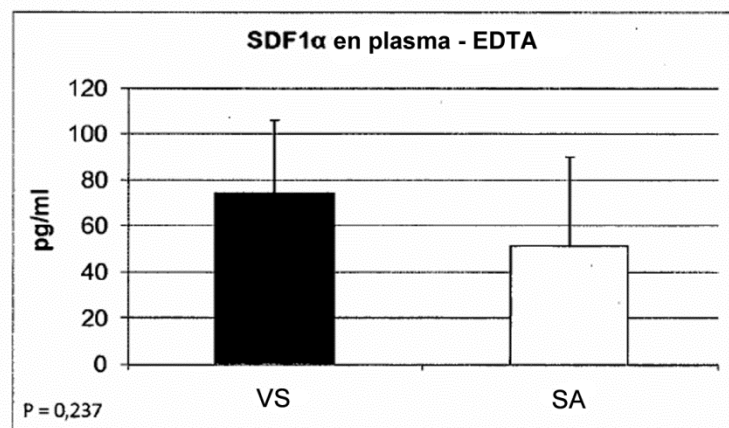


FIG 1C

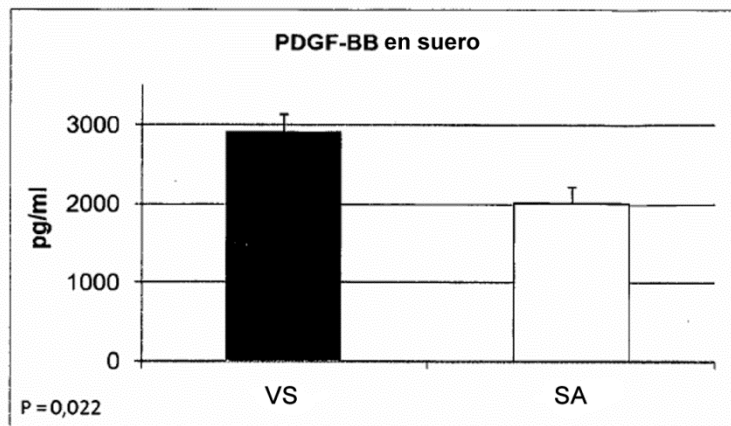


FIG 2

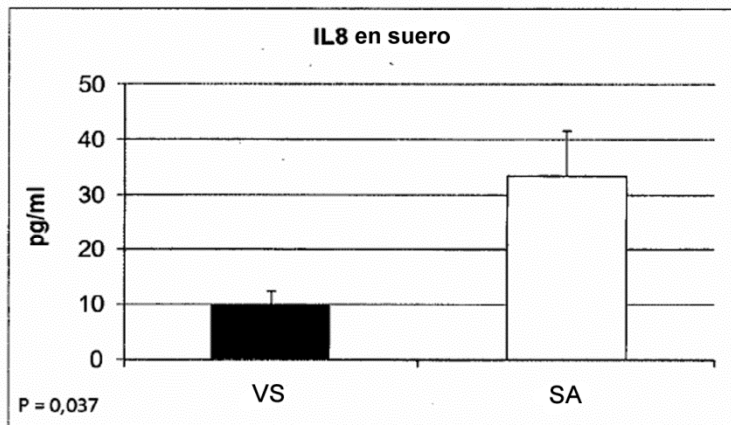


FIG 3

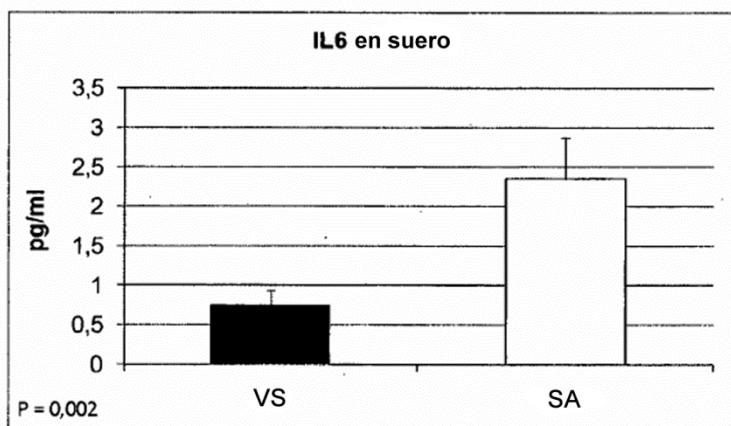


FIG 4

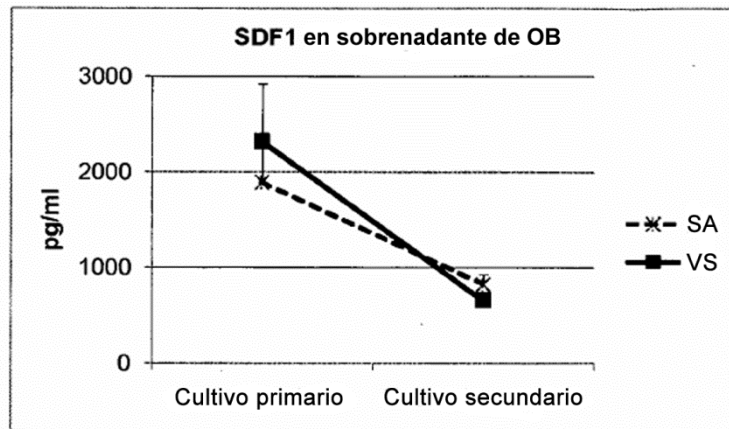


FIG 5A

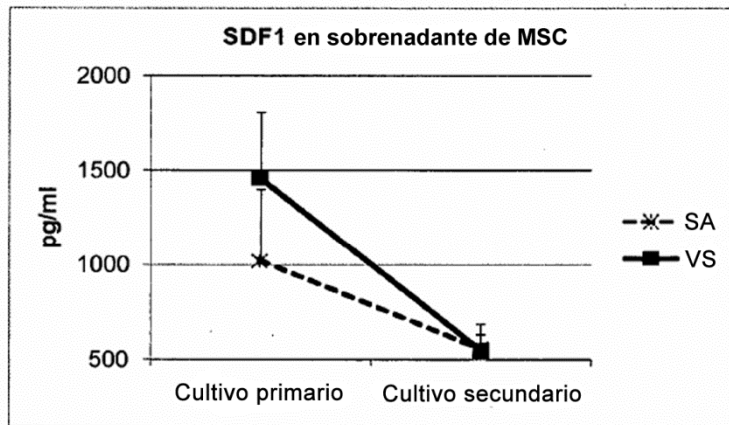


FIG 5B

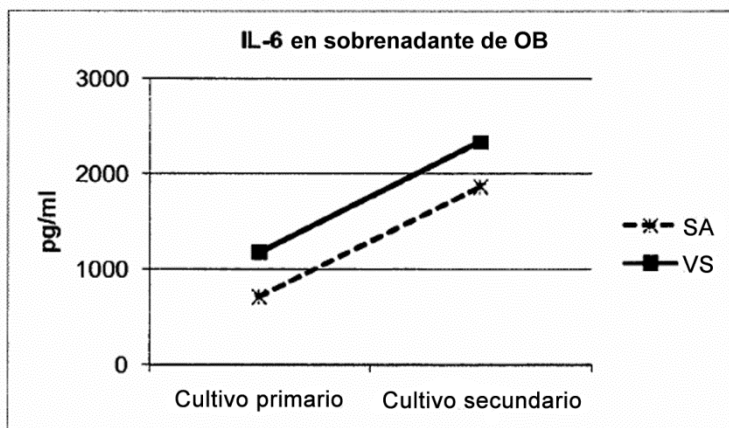


FIG 6