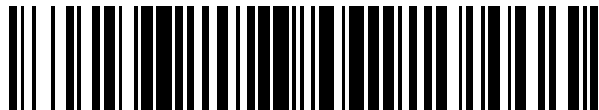


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 818**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2013 PCT/EP2013/066421**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.02.2014 WO14023703**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2013 E 13745116 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2880179**

54 Título: **Marcadores genéticos para predecir la capacidad de respuesta a un compuesto de FGF-18**

30 Prioridad:

06.08.2012 EP 12179391
07.08.2012 US 201261680480 P
13.03.2013 US 201361778912 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.03.2018

73 Titular/es:

MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE

72 Inventor/es:

LADEL, CHRISTOPH HUBERTUS;
BERTON, ALIX ANNE SIMONE;
VALSESIA, ARMAND y
FARMER, PIERRE JACQUES

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 660 818 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 genéticos para predecir la capacidad de respuesta a un compuesto de FGF-18

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, generalmente, a marcadores farmacogenéticos, más específicamente a marcadores genéticos asociados con la respuesta clínica a un compuesto de FGF-18 durante el tratamiento de un trastorno del cartílago. La presente invención se refiere más en particular a genes humanos, que se pueden usar para el diagnóstico y el tratamiento de trastornos del cartílago.

10 La invención divulga además polimorfismos o alelos específicos del gen IL1RN que se relacionan con la respuesta del cartílago al tratamiento con un compuesto de FGF-18, así como a las herramientas diagnósticas basadas en estas alteraciones de susceptibilidad. Por lo tanto, la invención se puede usar para predecir la respuesta al tratamiento con un compuesto de FGF-18. Se puede usar para seleccionar/identificar a los pacientes a tratar mediante la administración intra-articular de un compuesto de FGF-18. El uso de estos marcadores en el diagnóstico pueden dar como resultado un mayor beneficio y un menor riesgo para los pacientes.

Antecedentes de la invención

15 Los trastornos del cartílago se refieren en general a las enfermedades caracterizadas por la generación de defectos metabólicos en los tejidos conectivos los cuales se manifiestan con dolor, rigidez y limitación del movimiento de las partes del cuerpo afectadas. Estos trastornos pueden deberse a una patología o pueden ser el resultado de un trauma o lesión. Entre otros, los trastornos del cartílago incluyen la osteoartritis (OA, de sus siglas en inglés), lesión del cartílago (incluidas las lesiones deportivas del cartílago y de la articulación, y lesiones quirúrgicas, tales como las microfracturas). El cartílago maduro tiene limitada notablemente la capacidad para auto-repararse, ya que los condrocitos maduros tienen un potencial bajo para la proliferación y debido a la ausencia de vasos sanguíneos. Además, el cartílago no se nutre bien y tiene una baja presión de oxígeno. El reemplazamiento del cartílago dañado, en particular del cartílago articular, causado bien por una lesión o una enfermedad es un gran desafío para los médicos, y se considera que los procedimientos de los tratamientos quirúrgicos disponibles son impredecibles, y sólo son eficaces durante un tiempo limitado. Por lo tanto, la mayoría de los pacientes jóvenes o bien no solicitan tratamiento o bien se les aconseja posponer el tratamiento tanto como les sea posible. Cuando se requiere tratamiento, el procedimiento estándar depende de la edad y varía entre el reemplazamiento total de la articulación, el trasplante de las partes del cartílago, o la técnica de estimulación de la médula (tal como la microfractura). La microfractura es un procedimiento común que implica la penetración del hueso subcondral para estimular la deposición del cartílago mediante las células madre derivadas de la médula ósea. Sin embargo, se ha demostrado que esta técnica no repara el defecto condral de manera suficiente, y que el nuevo cartílago formado es principalmente fibrocartílago, dando como resultado una función y biomecánica, inadecuada o alterada. De hecho, el fibrocartílago no tiene la misma durabilidad y no se adhiere correctamente al cartílago hialino circundante. Por esta razón, el fibrocartílago recién sintetizado puede descomponerse más fácilmente (período de tiempo esperado: 5-10 años). Para pacientes con osteoartritis, el tratamiento no quirúrgico consiste especialmente en una terapia física, modificación del estilo de vida (por ejemplo reduciendo la actividad), dispositivos de apoyo, y fármacos de administración oral e inyectable (por ejemplo, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos) y control médico. Una vez que estos tratamientos fallan, la principal opción para los pacientes es la cirugía, tal como el reemplazo de la articulación. Tal opción puede producir una reducción de los síntomas que generalmente es sólo transitoria. Las osteotomías de tibia o fémur (cortar el hueso para reequilibrar el desgaste articular) puede reducir los síntomas, ayudar a mantener un estilo de vida activo, y retrasar la necesidad de un reemplazo total de la articulación. El reemplazo total de la articulación puede proporcionar alivio de los síntomas en la osteoartritis avanzada, pero generalmente requiere un cambio en el estilo de vida y/o en el nivel de actividad del paciente.

45 En ese momento, los tratamientos farmacológicos del mercado se dirigían principalmente al alivio del dolor. Aún no hay tratamientos comercialmente disponibles que restauren las lesiones del cartílago (véase Lotz, 2010).

El Factor 18 de Crecimiento del Fibroblasto (FGF-18) es un miembro de la familia de las proteínas FGF, estrechamente relacionado con el FGF-8 y el FGF-17. Se ha demostrado que el FGF-18 es un agente proliferativo para los condrocitos y los osteoblastos (Ellsworth et al., 2002; Shimoaka et al., 2002). El FGF-18 se ha propuesto para el tratamiento del trastorno del cartílago, tal como la osteoartritis y la lesión del cartílago, bien en solitario (WO2008/023063) o en combinación con ácido hialurónico (WO2004/032849).

55 La esprifermina (también conocida como factor 18 recombinante de crecimiento de fibroblastos humanos, rhFGF18), que es una forma truncada del FGF-18 humano, se está investigando en ensayos clínicos para el tratamiento tanto de la osteoartritis como de la lesión del cartílago (para más detalles véase por ejemplo NCT01033994, NCT00911469 y NCT01066871). El régimen de dosificación actual para esprifermina es de una vez a la semana durante 3 semanas (un ciclo de tratamiento), teniendo que administrar el fármaco mediante inyecciones por vía intra-articular. Este ciclo de tratamiento se puede repetir. Este régimen de dosificación se ha descrito en WO2008023063.

En ese momento, los tratamientos de la OA y de las lesiones del cartílago con FGF-18, durante los ensayos clínicos, se proporcionan a los pacientes sin información predictiva de la respuesta, es decir, sin conocer si el tratamiento

sería altamente eficaz, moderadamente eficaz o mostraría ser poco o nada eficaz. En la actualidad, una gran población de pacientes tratados muestra una respuesta intermedia/alta al tratamiento según con las puntuaciones de WOMAC con spifermin después de al menos un ciclo de tratamiento, sin embargo, algunos o bien no responden a dicho tratamiento, o bien responden mientras que presenten una puntuación WOMAC elevada en comparación con el control.

Aquí describimos los primeros marcadores genéticos que se asocian con la calidad de la respuesta clínica para el tratamiento del trastorno del cartílago, tal como la OA, la lesión del cartílago o microfracturas, con FGF-18. Tales marcadores son útiles para identificar antes del tratamiento, a través del cribado genético, los subgrupos de pacientes que son más propensos a mostrar una respuesta particular para el tratamiento con FGF-18, tal como una respuesta clínica muy buena para el tratamiento con FGF-18, o por el contrario a aquellos para los que la terapia puede fallar. El conocer el tipo de respuesta clínica de un paciente a un tratamiento se puede usar para optimizar la terapia o para seleccionar la terapia, tal como seleccionar el tratamiento con FGF-18 como la primera línea terapéutica o adaptar el régimen de dosificación. Tal información será clínicamente útil para el control médico del trastorno del cartílago en los pacientes, tal como la OA/lesión del cartílago. Por ejemplo, si se sabe que un individuo con OA o lesión del cartílago tiene un riesgo elevado de no responder al tratamiento de FGF-18, el médico puede excluir a dicho paciente del tratamiento con FGF-18. Además, tal información predictiva puede ser también útil clínicamente para guiar las decisiones del régimen de dosificación.

Compendio de la invención

La presente invención se dirige a un método para predecir la sensibilidad a un tratamiento con un compuesto de FGF-18 en un sujeto que tiene un trastorno del cartílago, comprendiendo el método las etapas de:

- a. Determinar, a partir de una muestra de ácido nucleico, el genotipo de ambos locus de IL-1RN rs9005 y de IL-1RN rs315952;
- b. Predecir a partir del resultado de la etapa a, la sensibilidad alta, intermedia, baja o inexistente de dicho sujeto al tratamiento con FGF-18.

Según dicho método, la presencia del genotipo G/C en IL-1RN rs9005 y de T/T en IL-1RN rs315952 es predictivo de una ausencia de respuesta o de una respuesta baja (es decir, sin sensibilidad) al tratamiento con un compuesto de FGF-18. Por el contrario, la presencia del genotipo A/G o A/A en IL-1RN rs9005 y de T/C o C/C en IL-1RN rs315952 es predictivo de una respuesta alta (alta sensibilidad) al tratamiento con un compuesto de FGF-18. Los demás genotipos en este locus son predictivos de sensibilidad intermedia (es decir, G/C en IL-1RN rs9005 y de T/C o C/C en IL-1RN rs315952 o A/G o A/A en IL-1RN rs9005 y T/T en IL-1RN rs315952; o C/C en el complemento de IL-1RN rs9005 y de A/G o G/G en el complemento de IL-1RN rs315952 o T/C o T/T en el complemento de IL-1RN rs9005 y A/A en el complemento de IL-1RN rs315952).

También se describe en la presente memoria, un método para seleccionar los pacientes que tienen un trastorno del cartílago para su inclusión o exclusión al tratamiento, o a ensayos clínicos, con un compuesto de FGF-18, en base de su posible sensibilidad a dicho tratamiento, que comprende determinar, a partir de una muestra de ácido nucleico, el genotipo de ambos locus en IL-1RN rs9005 y IL-1RN rs315952, en donde el genotipo del paciente con respecto a dicho locus es predictivo del riesgo del paciente de ser sensible o no sensible a dicho tratamiento, y seleccionar los pacientes sensibles de ser adecuados para dicho tratamiento. En particular, los pacientes que tienen el genotipo G/G en IL-1RN rs9005 y T/T en IL-1RN rs315952 se clasificarán como no sensibles. Como tal, estos sujetos se podrán excluir del tratamiento con un compuesto de FGF-18, o de los ensayos clínicos. De lo que se deduce que los sujetos que tienen cualquier otro genotipo distinto en estos locus (es decir, G/G en IL-1RN rs9005 y T/C o C/C en IL-1RN rs315952 o A/G o A/A en IL-1RN rs9005 y T/T, T/C o C/C en IL-1RN rs315952) se clasificarán como sensibles, comprendiendo tanto a los sujetos de sensibilidades intermedias como los sujetos súper sensibles (o de sensibilidades altas), y por tanto, se podrían incluir en el tratamiento (o adecuar para) o en los ensayos clínicos, con el compuesto de FGF-18.

La presente invención proporciona además un método para seleccionar pacientes que tienen un trastorno del cartílago para un régimen terapéutico alternativo con un compuesto de FGF-18, basado en su probabilidad para ser súper-sensibles para el tratamiento con el compuesto de FGF-18, que comprende determinar, a partir de una muestra de ácido nucleico, el genotipo de ambos locus de IL-1RN rs9005 y IL-1RN rs315952, en donde el genotipo del paciente con respecto a dicho locus es predictivo del riesgo del paciente de ser súper-sensible a un tratamiento con dicho compuesto de FGF-18, y de seleccionar dicho paciente para un régimen terapéutico alternativo que sería adecuado para dicho paciente. Preferiblemente, en tal régimen terapéutico alternativo, la dosis total del compuesto de FGF-18 que se administra se podría reducir en comparación con la dosis del compuesto de FGF-18 a administrar a un paciente que no presenta riesgo de ser súper-sensible al tratamiento del compuesto de FGF-18. En particular, los pacientes que tienen el genotipo A/G o A/A en el IL-1RN rs9005 junto con T/C o C/C en IL-1RN rs315952, siendo clasificado como súper-sensibles, se seleccionan para un régimen de tratamiento alternativo en los que se reduce la dosis de FGF-18 a administrar.

Se proporciona también un método para seleccionar pacientes que tienen un trastorno del cartílago para un régimen

terapéutico alternativo con un compuesto de FGF-18, en base a su posibilidad de sufrir efectos AIR cuando se tratan con un compuesto de FGF-18, que comprende determinar, a partir de una muestra de ácido nucleico, el genotipo de ambos locus IL-1RN rs9005 y IL-1RN rs315952, en donde el genotipo del paciente con respecto a dicho locus es predictivo del riesgo del paciente para desarrollar efectos AIR en respuesta al tratamiento con dicho compuesto de FGF-18, y seleccionando dicho paciente para un régimen terapéutico alternativo que será adecuado para dicho paciente. Preferiblemente, en tal régimen terapéutico alternativo, la dosis total del compuesto FGF-18 que se administra se podría reducir en comparación con la dosis del compuesto FGF-18 que se administra a un paciente que no presenta un riesgo para desarrollar efectos AIR. En particular, los pacientes que tienen el genotipo A/G o A/A en IL-1RN rs9005 junto con T/C o C/C en IL-1RN rs315952, se clasifican como en riesgo de desarrollar efectos AIR, se seleccionan para un régimen terapéutico alternativo en el que se reduce la dosis de FGF-18 a administrar.

En un aspecto de referencia, la presente divulgación se refiere a un compuesto de FGF-18 para usar en el tratamiento de un paciente que tiene un trastorno del cartílago, caracterizado en que el paciente tiene alguna combinación del genotipo o genotipos que se seleccionan del grupo que consiste en: 1) G/G en IL-1RN rs9005 y T/C o C/C en IL-1RN rs315952, y 2) A/G o A/A en IL-1RN rs9005 y T/T, T/C o C/C en IL-1RN rs315952. El paciente se debería clasificar como súper-sensible, es decir, un sujeto que tiene los genotipos A/G o A/A en IL-1RN rs9005 junto con T/C o C/C en IL-1RN rs315952, se debería tratar a dicho paciente con un compuesto de FGF-18 de dosis reducida, en comparación con un sujeto que tiene una de las otras dos combinaciones de genotipos.

En realizaciones particulares de la presente invención en su conjunto, es decir, en cualquiera de los métodos o usos mencionados en la presente memoria, el compuesto de FGF-18 que se usa como tratamiento es esprifermina, y el paciente tiene un trastorno del cartílago que se selecciona del grupo que consiste en osteoartritis, lesión del cartílago, fracturas que afectan al cartílago de la articulación o procedimientos quirúrgicos con impacto sobre el cartílago de la articulación (por ejemplo, microfractura).

Se entenderá que en cualquiera de los métodos o usos mencionados en la presente memoria, antes de determinar el genotipo en uno de los locus, es necesario obtener una muestra de ácido nucleico (o muestra de ensayo) de dicho sujeto, por ejemplo a través de la recogida de sangre o saliva. Alternativamente la muestra de ensayo se selecciona de células bucales, orina o heces. Preferiblemente, la muestra de ácido nucleico es una muestra de ADN. Además, se entenderá también que cualquiera de los métodos o usos mencionados en la presente memoria se realizan *in vitro*, y no en el organismo animal o humano.

Se entenderá también que en el contexto de la invención en su conjunto, la determinación se puede realizar en la secuencia complementaria correspondiente a IL-1RN rs90005 y IL-1RN rs315952.

Definiciones

- El término "compuesto de FGF-18" o "FGF-18", como se emplea en la presente memoria, está destinado a ser una proteína que mantiene al menos una actividad biológica de la proteína FGF-18 humana. El FGF-18 puede ser nativa, en su forma madura, o una forma truncada de la misma. Las actividades biológicas de la proteína FGF-18 humana incluyen especialmente la alta actividad osteoblástica (véase WO98/16644) o en la formación del cartílago (véase WO2008/023063). La FGF-18 humana nativa, o de tipo salvaje, es una proteína que se expresa por los condrocitos del cartílago articular. La FGF-18 humana se designó primero como zFGF-5 y se describe de forma completa en WO98/16644. SEQ ID NO:1 corresponde a la secuencia de aminoácidos del FGF-18 humano nativo, con un péptido señal que consiste en restos aminoácidos 1(Met) a 27(Ala). La forma madura del FGF-18 humano corresponde a la secuencia de aminoácidos del resto 28(Glu) al resto 207(Ala) de SEQ ID NO:1 (180 aminoácidos). El término también incluye la proteína de fusión, en donde la proteína FGF-18 se acopla con una proteína heteróloga o un compuesto químico.

El FGF-18, en la presente invención, se puede producir mediante métodos recombinantes, tal como los enseñados en la solicitud WO2006/063362. Dependiendo de los sistemas y las condiciones de expresión, el FGF-18 en la presente invención se expresa en una célula hospedadora recombinante con un resto inicial de Metionina (Met) o con una secuencia señal para la secreción. Cuando se expresa en hospedadoras procariotas, tales como en *E. coli*, el FGF-18 contiene un resto adicional de Metionina en el N-terminal de su secuencia. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del FGF-18 humano, cuando se expresa en *E. coli*, comienza con un resto de Metionina en el N-terminal (posición 1) seguido del resto 28 (Glu) al resto 207 (Ala) de SEQ ID NO:1.

- El término "forma truncada" de FGF-18, como se emplea en la presente memoria, se refiere a una proteína que comprende o consiste en los restos 28 (Glu) al 196 (Lys) de SEQ ID NO:1. Preferiblemente, la forma truncada de la proteína FGF-18 es el polipéptido designado "trFGF-18" (170 aminoácidos), que comienza con un resto de Metionina (en el N-terminal) seguido de los restos aminoácidos 28 (Glu) -196 (Lys) del FGF-18 humano de tipo salvaje. La secuencia de aminoácidos de trFGF-18 se muestra en SEQ ID NO:2 (restos aminoácidos 2 a 170 de SEQ ID NO:2 correspondientes a los restos aminoácidos 28 a 196 de SEQ ID NO:1). La trFGF-18 es una forma truncada recombinante del FGF-18 humano, producida en *E. coli* (véase WO2006/063362). La Denominación Común Internacional (DCI) para esta forma particular del FGF-18 es esprifermina. La esprifermina ha demostrado exhibir actividades similares al FGF-18 humano maduro, por ejemplo aumenta la proliferación de condrocitos y la deposición del cartílago conduciendo a la reparación y la reconstrucción para una variedad de tejidos cartilagosos

(véase WO2008/023063).

- 5 - “Trastorno del cartílago”, como se emplea en la presente memoria, abarca a todos los trastornos que son consecuencia de daños debido a una lesión, tal como una lesión traumática, condropatía o artritis. Ejemplos de trastornos del cartílago que se pueden tratar mediante la administración de la formulación de FGF-18 descrita en la presente memoria incluyen pero no se restringe a la artritis, tal como la osteoartritis, lesión del cartílago, fracturas que afectan al cartílago de la articulación o procedimientos quirúrgicos con un impacto en el cartílago de la articulación (por ejemplo, microfractura). Las enfermedades/trastornos degenerativos del cartílago o de la articulación, tal como la condrocalcinosis, policondritis, policondritis recurrente, espondilitis anquilosante o costocondritis también se engloban en estos términos. La Sociedad Internacional de Reparación del Cartílago ha propuesto un sistema de clasificación artroscópico para evaluar la gravedad del defecto del cartílago: grado 0: (normal) cartílago sano, grado 1: el cartílago tiene un punto o unas vesículas blandas, grado 2: pequeños desgarros visibles en el cartílago, grado 3: las lesiones tienen grietas profundas (más del 50% de la capa del cartílago) y grado 4: el desgarrado del cartílago expone el hueso subyacente (subcondral) (véase por ejemplo la página 13 de http://www.cartilage.org/_files/contentmanagement/ICRS_evaluation.pdf).
- 15 - El término “Osteoartritis” se emplea para referirse a la forma más común de la artritis. El término “osteoartritis” engloba tanto a la osteoartritis primaria como a la osteoartritis secundaria (véase, por ejemplo, The Merck Manual, 17ª edición, página 449). La forma más común de clasificar/valorar la osteoartritis es el uso de la escala de clasificación radiográfica de Kellgren-Lawrence (véase la tabla de abajo). La osteoartritis se puede causar por la ruptura del cartílago. Se pueden romper fragmentos del cartílago y causar dolor e inflamación en la articulación entre los huesos. Con el tiempo, el cartílago entero se puede desgastar, y los huesos rozarán entre sí. La osteoartritis puede afectar a cualquier articulación pero normalmente afecta a las articulaciones de las manos, y las que soportan el peso, tales como las caderas, rodillas, pies, y columna vertebral. En un ejemplo preferido, la osteoartritis puede ser osteoartritis de rodilla u osteoartritis de cadera. La osteoartritis es uno de los trastornos del cartílago preferidos que se pueden tratar mediante la administración de los compuestos de FGF-18 según la presente invención.
- 20
- 25 La Escala de Clasificación Radiográfica de Kellgren-Lawrence de la Osteoartritis se describe como sigue:

Grado de la Osteoartritis	Descripción
0-Ninguno	No hay señales radiográficas de osteoartritis
1-Dudoso	Estrechamiento dudoso del espacio articular y posible osteofitosis
2-Leve	Osteofitosis definida, estrechamiento del espacio articular indudable
3-Moderado	Osteofitosis múltiple moderada, estrechamiento definido de los espacios articulares, algo de esclerosis y posible deformidad del contorno del hueso
4-Grave	Gran osteofitosis, estrechamiento marcado del espacio articular, esclerosis grave y evidente deformidad del contorno del hueso

- 30 - El término “lesión del cartílago” como se emplea en la presente memoria es un trastorno del cartílago o daño del cartílago resultante especialmente a partir de un trauma. Las lesiones del cartílago pueden aparecer especialmente después de una destrucción mecánica traumática, especialmente posterior a un accidente o cirugía (por ejemplo cirugía por microfractura). Este término “lesión del cartílago” incluye también a la fractura condral u osteocondral, lesión del menisco, y el término microfractura. También se considera que está dentro de esta definición la lesión relacionada con el deporte o el desgaste de los tejidos de la articulación relacionado con el deporte.
- El término AIR (reacción inflamatoria aguda) como se emplea en la presente memoria se define como sigue. Dentro del período del día 1 a 7, preferiblemente dentro del período de 3 días, tras la inyección intra-articular del compuesto FGF-18 en la diana de ambas rodillas, se deben cumplir los siguientes criterios:
- 35

- Presentarse inflamación (efusión del fluido sinovial)
- Aumento del dolor de 30 mm sobre 100 mm en la Escala Análoga Visual (VAS, de sus siglas en inglés)

- 40 - Un “alelo” es una forma particular de un gen, un marcador genético u otro locus genético, que es distinguible de otras formas del gen, marcador genético u otro locus genético; por ejemplo, sin limitación su secuencia de nucleótidos particular. El término alelo incluye también por ejemplo sin limitación una forma de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, de sus siglas en inglés). Un individuo puede ser homocigótico para un determinado alelo en

células diploides; es decir, el alelo es idéntico en ambos pares de cromosomas; o heterocigótico para dicho alelo; es decir, los alelos no son idénticos para ambos pares de cromosomas.

- El término “marcador genético”, “biomarcador” o “marcador” se refiere a un locus (genético) polimórfico identificable. Un ejemplo sin limitación de un marcador genético es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP).

5 - Un “polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)” es la variación de una secuencia de ADN que aparece cuando difiere un solo nucleótido – A (para Adenina), T (para Timina), C (para Citosina), o G (para Guanina)- en el genoma (u otras secuencias compartidas entre individuos de una especie) difiere entre individuos de una especie (o entre cromosomas apareados en un individuo). Un SNP frecuentemente va precedido y le sigue, una secuencia muy conservada en la población de interés y, por tanto, la localización de un SNP normalmente se produce en referencia a una secuencia de ácido nucleico de consenso de treinta a sesenta nucleótidos que soportan el locus del marcador genético, que a veces es referido como una secuencia de contexto para el SNP. Los SNPs que se analizaron por los presentes investigadores en relación con el tratamiento del trastorno del cartílago con esprifermina son los mostrados en la Tabla 1.

10
15 - Un “genotipo” como se emplea en la presente memoria, se refiere a la combinación de ambos alelos de un marcador genético, por ejemplo, sin limitación de un SNP, en un solo locus genético en cromosomas apareados (homólogos) en un individuo. “Genotipo” como se emplea en la presente memoria se refiere también a la combinación de alelos de más de un locus genético, por ejemplo, sin limitación de SNPs, en un par o más de un par de cromosomas homólogos en un individuo.

20 - El término “Haplotipo” se refiere a variantes o alelos a partir de marcadores distintos (por ejemplo SNPs) que se localizan en el mismo sitio en el mismo cromosoma. La información del genotipo del SNP, medida a partir de una combinación de SNP o de ensayos Taqman, está desfasada (es decir, el cromosoma parental de origen no se conoce para cada alelo). Los métodos computacionales (Browning y Browning, 2011) usan la información a través de los individuos para estimar (es decir, deducir) la fase del haplotipo a partir de la información del genotipo.

25 - El término “Genotipado” se refiere a un proceso para determinar un genotipo de un individuo, bien para un único SNP o para muchos SNPs.

30 - “Locus” o “locus genético” se refiere a una localización específica en un cromosoma u otro material genético. Por ejemplo, IL-1RN rs9005 es un locus y se puede denominar, en el marco de la presente invención, bien como “IL-1RN rs9005” o “locus IL-1RN rs9005”. Se aplica lo mismo para IL-1RN rs315952. Como es evidente para el experto en la técnica, a partir de la base de datos de la NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica, de sus siglas en inglés) para estos SNPs, el genotipo para determinar ambos IL-1RN rs9005 y IL-1RN rs315952, es el que está en posición 27 en cada uno de los estos locus, es decir, en la posición 27 de SEQ ID NO:6 y en posición 27 de SEQ ID NO:7.

35 - El término “SNP1” en el contexto de la presente invención, es la posición 27 de SEQ ID NO:6, también identificado como rs9005 en la base de datos de la NCBI. SEQ ID NO:6 es una parte de la secuencia de ácidos nucleicos del genoma del antagonista del receptor de interleuquina 1 (IL-1RN). Los términos “IL-1RN rs9005”, “rs9005” o “SNP1” se emplean de forma intercambiable.

- El término “SNP2” se refiere a la posición 27 de SEQ ID NO:7 identificado como rs315952 en la base de datos de la NCBI. SEQ ID NO:7 es una parte de la secuencia de ácidos nucleicos del genoma de IL-1RN. Los términos “IL-1RN rs315952”, “rs315952” o “SNP2” se emplean de forma intercambiable.

40 - El término “sonda” o “cebador” se refiere a un oligonucleótido, es decir, a un ácido nucleico o a un derivado de ácido nucleico; incluyendo sin limitación a un ácido nucleico bloqueado (LNA, de sus siglas en inglés), ácido nucleico peptídico (PNA) o ácido nucleico puenteado (BNA); que normalmente es de entre 5 y 100 bases contiguas en longitud, y lo más frecuente entre 5-40, 5-35, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-50, 10-40, 10-30, 10-25, 10-20, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25, 15-20, 20-50, 20-40, 20-30 ó 20-25 bases contiguas en longitud. La secuencia de una sonda/un cebador se puede diseñar para hibridarse específicamente a una de las formas alélicas de un marcador genético; tales oligonucleótidos se refieren como sondas alelo-específicas. Si el marcador genético es un SNP, el alelo complementario para el SNP puede aparecer en cualquier posición dentro de la sonda alelo-específica. Otras sondas/cebadores útiles en la práctica de la invención hibridan específicamente a una región diana adyacente a un SNP con su extremo 3' localizado a menos de o aproximadamente igual a 10 nucleótidos a partir del locus del marcador genético, preferiblemente ≤ 5 nucleótidos. Tales sondas/cebadores que hibridan adyacentes a un SNP son útiles en los métodos de extensión del cebador mediado por polimerasa y son referidos en la presente memoria como “oligonucleótidos de extensión del cebador”. En una realización preferida, el extremo 3' de un oligonucleótido de extensión del cebador es un desoxinucleótido complementario al nucleótido localizado adyacente inmediatamente al SNP.

55 - El término “polimorfismo” se refiere a dos o más formas alternas (alelos) de un locus genético en una población que difiere en la secuencia de nucleótidos o tienen un número variable de unidades nucleótidas repetidas. Los polimorfismos pueden aparecer en regiones codificantes (exones), en regiones de genes no codificantes o fuera de los genes (regiones intergénicas). Los distintos alelos de un polimorfismo aparecen normalmente en una población

en diferentes frecuencias, el alelo que aparece de la forma más frecuente en una población seleccionada se refiere a veces como el alelo “principal” o “de tipo salvaje”. Los organismos diploides pueden ser homocigóticos o heterocigóticos para los diferentes alelos existentes. Un polimorfismo bialélico tiene dos alelos.

5 - El término “Epistasia” se emplea generalmente para definir la interacción entre genes. La epistasia se definió primero por Bateson (Bateson y Mendel, 1909) para describir un efecto de enmascaramiento a través del cual una variante o alelo en un locus previene que la variante en otro locus manifieste su efecto.

10 Sin embargo, la bibliografía científica proporciona muchas definiciones diferentes (Phillips, 1998; Cordell, 2002). En la presente memoria, la epistasia se ensayó como la interacción estadística entre genotipos de dos SNPs distintos. Esto es similar a la definición propuesta por Fisher en 1918 (Fisher, 1918), es decir, una desviación en la adición del efecto de alelos en diferentes locus con respecto a su contribución a un fenotipo.

15 - Las “puntuaciones totales de WOMAC” o “puntuaciones de WOMAC” (“WOMAC” para “Puntuación del Índice de Osteoartritis de las Universidades de Western Ontario y MacMaster”) miden el dolor (puntuación del dolor WOMAC), la función (puntuación de la función WOMAC) y la rigidez (puntuación de la rigidez WOMAC). Cuando se aplica al ensayo del dolor y a la disfunción asociada con la lesión del cartílago, consiste en un cuestionario que contiene 24 preguntas divididas en 3 subescalas (5 preguntas para el Dolor, 2 preguntas para la Rigidez, y 17 preguntas para la Función Física) (véase Bellamy et al., 1998; Wolfe, 1999). Es un instrumento bien conocido, muy utilizado especialmente en la valoración de la gravedad de la OA.

20 - Para evaluar la reparación del cartílago, se realizaron mediciones del volumen del cartílago a través de mediciones de imagen de resonancia magnética (MRI), que incluyen el Volumen total del cartílago (también referido como LFTC (compartimento femoro-tibial lateral) + MFTC (compartimento femoro-tibial medio)), Volumen lateral del cartílago (también referido como LFTC), Volumen medio del cartílago (también referido como MFTC), y nuevo engrosamiento medio total del cartílago.

25 - El término “de referencia” significa antes del tratamiento (es decir, al comienzo del estudio). Se refiere especialmente a las variables clínicas, tales como, pero no limitadas a, el volumen del cartílago y la puntuación total de WOMAC de un paciente dado en el inicio del estudio (es decir, antes del tratamiento con el compuesto de FGF-18 o del placebo).

30 - Los pacientes “sensibles” son los que muestran una respuesta al tratamiento de un trastorno del cartílago con un compuesto de FGF-18. Preferiblemente, los pacientes sensibles (o pacientes que muestran sensibilidad al tratamiento) muestran especialmente un mayor incremento en el volumen del cartílago total que los sujetos tratados con el placebo, es decir, muestran reparación del cartílago. Además, los pacientes sensibles muestran al menos una mejora similar en las puntuaciones totales de WOMAC que los pacientes con placebo. Los términos “súper sensibles”, “sensibles intermedios” y “no sensibles” se refieren a los diferentes grupos de pacientes dependiendo especialmente del incremento del volumen del cartílago tras el tratamiento con el compuesto de FGF-18. Los pacientes súper sensibles muestran una mayor respuesta (es decir, reparación alta del cartílago) al tratamiento con un compuesto de FGF-18, los pacientes sensibles intermedios muestran una respuesta buena o intermedia (es decir, reparación buena o intermedia del cartílago) al tratamiento con un compuesto de FGF-18, y los pacientes no sensibles muestran una respuesta nula o baja al tratamiento con un compuesto de FGF-18. Tanto los sujetos súper-sensibles como los sensibles tienen una mejora similar en la puntuación total de WOMAC que las de los sujetos placebo. En cambio, los sujetos que no responden tienen una mejora significativamente más pequeña en la puntuación total de WOMAC que la de los sujetos placebo. El término “súper sensibles” o “muy sensibles” se emplean de forma intercambiable. Cabe señalar que los sujetos súper sensibles han mostrado presentar mayor riesgo de efectos AIR.

35 Más en particular, los términos “sensibles intermedios”, “súper sensibles”, y “no sensibles” incluyen, pero no se limitan a, los diferentes grupos de pacientes dependiendo del aumento del volumen del cartílago y de la mejora en la puntuación total de WOMAC, después del tratamiento con el compuesto de FGF-18.

Los criterios propuestos para los pacientes sensibles son los siguientes:

1. Aumento positivo del cartílago (entre +10 y +100mm³) en comparación a los sujetos de referencia,
2. Cambio del aumento del cartílago significativamente mayor que el cambio en los sujetos placebo (por ejemplo, como se evalúa con un modelo lineal por ajuste del IMC (Índice de Masa Corporal), grado KL, sexo y edad, y con alfa = 5%),
3. Mejora de la puntuación de WOMAC, es decir, disminución (por ejemplo, más de 5 puntos de reducción) en comparación con los sujetos de referencia,
4. El cambio en la puntuación de WOMAC no es significativamente mayor que el cambio en los sujetos placebo (por ejemplo, como se evalúa con un modelo lineal por ajuste del IMC, grado KL, sexo y edad, y con alfa = 5%).

Los criterios propuestos para los sujetos súper sensibles son los mismos que para los sensibles, pero con un incremento del cartílago mayor de 100mm^3 (criterio #1) en comparación con los sujetos de referencia.

Los sujetos no sensibles se pueden definir como los que no cumplen los criterios #1 o #2 y no cumplen los criterios #3 o #4.

5 Por tanto, los sujetos sensibles intermedios muestran una respuesta buena o intermedia (o una sensibilidad buena o intermedia) al tratamiento con un compuesto de FGF-18 (véanse los criterios anteriores; según los ejemplos, cambio medio: aumento del volumen del cartílago total de $+84,81\text{mm}^3$ en comparación con los sujetos de referencia; cambio medio: -20 puntos en la puntuación total de WOMAC, en comparación con los sujetos de referencia; y sin diferencia significativa en la puntuación total de WOMAC en comparación con los sujetos placebo). Los sujetos súper sensibles muestran una respuesta alta (o una sensibilidad alta) al tratamiento con un compuesto de FGF-18 (véanse los criterios anteriores; según los ejemplos, cambio medio: aumento del volumen del cartílago total de $+119,46\text{mm}^3$ en comparación con los sujetos de referencia, representando un incremento de $+40,85\%$ (es decir, beneficioso) en comparación con los sujetos sensibles; cambio medio: -10 puntos en la puntuación total de WOMAC, en comparación con los sujetos de referencia; y sin diferencia significativa en la puntuación total de WOMAC en comparación con los sujetos placebo). Los sujetos no sensibles muestran una respuesta nula o baja (o una sensibilidad nula o baja) al tratamiento con un compuesto de FGF-18 (véanse los criterios anteriores; según los ejemplos: aumento significativamente más pequeño en el volumen del cartílago total en comparación con los sujetos placebo (diferencia entre las medias: $-106,64\text{mm}^3$); mejora pequeña (cambio medio: -1 punto) en las puntuaciones totales de WOMAC en comparación con los sujetos de referencia; y diferencia significativa en la puntuación total de WOMAC en comparación con los sujetos placebo).

25 - La "respuesta", o "sensibilidad" a un tratamiento con un compuesto de FGF-18 se entiende como 1 año después de la primera inyección y medido como 1) incremento del volumen del cartílago, medido, por ejemplo, mediante MRI o Rayos X, 2) descenso en las puntuaciones totales de WOMAC, y 3) los cambios en las puntuaciones totales de WOMAC no son significativamente mayores que los de los sujetos placebo (referidos también a la definición de "sensible").

30 - Un "biomarcador pronóstico" informa acerca de la condición del sujeto, incluyendo y no limitado a la evaluación de la enfermedad, gravedad de la enfermedad o efectos de la enfermedad, con independencia a cualquier terapia. Un "biomarcador predictivo" informa acerca del efecto de recibir una terapia, que incluye pero no se limita a los resultados de eficacia y seguridad. Las definiciones de pronóstico y predictivo no se excluyen mutuamente, por tanto, un biomarcador puede ser tanto pronóstico como predictivo.

- Como se emplea en la presente invención, el término "MAD" significa Dosis Múltiples Ascendentes. Cuando esta sigla es seguida por una figura, la figura corresponde a la dosis a la que el compuesto de FGF-18 se ha inyectado durante el tratamiento. Por ejemplo, MAD 100 se refiere a un tratamiento durante el cual un paciente recibe mediante inyección 100mg del compuesto de FGF-18. La abreviatura "PL" (y "MADPL") se refieren al placebo.

35 - El término "dispositivo de almacenamiento", como se emplea en la presente memoria, se destina a incluir a cualquier aparato de cálculo o procesamiento u otro dispositivo configurado o adaptado para almacenar datos o información. Ejemplos de aparatos electrónicos adecuados para usar con la presente invención incluyen aparatos informáticos independientes, redes de telecomunicaciones de datos, incluyendo redes de área local (LAN), redes de área ancha (WAN), Internet, Intranet, y Extranet, y sistemas distribuidos de procesamiento informático. Los dispositivos de almacenamiento incluyen también, pero no se limitan a: medios de almacenamiento magnéticos, tales como discos flexibles, medios de almacenamiento de disco duro, cinta magnética, medios de almacenamiento óptico, tales como el CD-ROM, DVD, medios de almacenamiento electrónico, tales como RAM, ROM, EPROM, EEPROM y similares, discos duros en general e híbridos de estas categorías, tales como medios de almacenamiento magnético/óptico.

45 - Como se emplea en la presente memoria, el término "almacenado" se refiere a un proceso para codificar información en el dispositivo de almacenamiento. Los expertos en la técnica pueden adoptar fácilmente cualquiera de los métodos conocidos para registrar información en un medio conocido para producir productos manufacturados que comprenden la información a un nivel de expresión.

Descripción detallada de la invención

50 Existe una necesidad para predecir la eficacia clínica (especialmente con respecto a la reparación del cartílago) de un compuesto de FGF-18 para el tratamiento de pacientes que tienen un trastorno del cartílago, tal como osteoartritis, lesión del cartílago, fracturas que afectan al cartílago de la articulación o procedimientos quirúrgicos con impacto sobre el cartílago de la articulación (por ejemplo, microfractura). Para optimizar el tratamiento de dichos pacientes, es importante identificar biomarcadores que se puedan usar para predecir la respuesta de un paciente dado al tratamiento con un compuesto de FGF-18, especialmente con respecto a la reparación del cartílago. Tales biomarcadores predictivos se pueden usar para identificar a los grupos de mayor riesgo de ser no sensibles o, por el contrario, de ser súper sensibles al tratamiento. Por ejemplo, si un paciente que tiene osteoartritis se conoce por tener un alto riesgo de no responder (o de ser no sensible) al tratamiento, el médico puede decidir no proponer un

compuesto de FGF-18, tal como esprifermina, a dicho paciente. Por el contrario, si un paciente que tiene osteoartritis se conoce que tiene un alto riesgo de ser súper sensible al tratamiento, el médico puede decidir adaptar el régimen de dosificación, para administrar la dosis menor del compuesto de FGF-18 a dicho paciente. Tal información predictiva puede ser útil clínicamente para guiar las decisiones médicas, especialmente en el momento en el que se necesita reemplazamiento articular quirúrgico.

El sorprendente descubrimiento de la presente invención se basa en el estudio dirigido a identificar biomarcadores potenciales asociados con la administración de esprifermina. Los biomarcadores empleados en este estudio se componían de ambos marcadores genéticos de los candidatos (véase la Tabla 1) y menos de 1 millón de SNPs que cubren el genoma humano con un marcador medio de 680 bases de espacio. Se ensayó la asociación entre los marcadores genéticos y las respuestas clínicas variables. La razón de este tipo de análisis era identificar biomarcadores que pudieran ser predictivos del resultado clínico (especialmente con respecto a la reparación del cartílago), para un paciente a tratar con un compuesto de FGF-18, tal como esprifermina. Estos SNPs se podrían utilizar para separar poblaciones de pacientes y dirigirse a las poblaciones específicas. Los investigadores han descubierto sorprendentemente una asociación con determinados biomarcadores (o SNPs) y el resultado (por ejemplo, reparación del cartílago), así como los efectos adversos de la terapia con FGF-18. Son de especial interés los SNPs rs9005 y rs315952, ambos localizados en el gen IL-1RN (véase la Figura 1).

Estos biomarcadores se han descrito en la bibliografía, siendo posible relacionarlos a enfermedad grave y progresión en pacientes con OA (véase por ejemplo WO2009/135218, US20120115137 o Attur et al., 2010), utilizando un haplotipo (denominado haplotipo C-T-A) que incluye rs419598 (C), rs315952 (T) y rs9005 (A) (véase, por ejemplo, WO2009/135218 o Attur et al., 2010) o utilizando el haplotipo que incluye rs419598 (T), rs315952 (T) y rs9005 (G) (véase, por ejemplo, US20120115137). Curiosamente, aunque dos de estos biomarcadores, es decir, rs9005 y rs 315952, se correlacionan fuertemente con la respuesta al tratamiento de FGF-18, como se muestra en la presente invención, el tercero, es decir, rs419598, no parece estar implicado además en el fenotipo observado, aunque se describe, en la bibliografía, como que está unido a los otros dos SNPs. De hecho, el denominado haplotipo C-T-A no permitió clasificar a los sujetos por el cambio en el volumen del cartílago total (Figura 2) o por no cambiar en la puntuación total de WOMAC (Figura 3). Por tanto, el haplotipo C-T-A no se identificó como un buen predictor de la respuesta a la terapia con FGF-18.

Por el contrario, sorprendentemente, los presentes investigadores han encontrado que los alelos A del biomarcador rs9005, junto con C del biomarcador rs315952 se asocian con una mejor respuesta al tratamiento con un compuesto de FGF-18, tal como esprifermina, en sujetos afectados con lesión del cartílago (Tabla 4). Estos sujetos se denominan súper sensibles o muy sensibles.

Por el contrario, sorprendentemente, los presentes investigadores han encontrado que el genotipo T/T rs315952 junto con G/G rs9005 se asocia con la ausencia de, o una baja respuesta al tratamiento con un compuesto de FGF-18 (es decir, sin sensibilidad al tratamiento con un compuesto de FGF-18), tal como esprifermina, en sujetos afectados con un trastorno del cartílago (Tabla 4). Estos sujetos se denominan no sensibles. Se deduce que los pacientes que tienen cualquier otro genotipo en ambos locus (es decir, G/G en IL-1RN rs9005 y T/C o C/C en IL-1RN rs315952 o A/G o A/A en IL-1RN rs9005 y T/T en IL-1RN rs315952) son sensibles intermedios.

Por otra parte, es un descubrimiento de la presente invención que el locus polimórfico IL-1RN rs9005 y IL-1RN rs315952 se pueden usar en combinación como biomarcadores predictivos de la respuesta de un sujeto al tratamiento con el compuesto de FGF-18, tal como esprifermina (Tabla 4). Preferiblemente, el sujeto tiene un trastorno del cartílago, tal como osteoartritis, lesión del cartílago, fracturas que afectan al cartílago de la articulación o procedimientos quirúrgicos con impacto sobre el cartílago de la articulación (por ejemplo, microfractura). En una realización particular, el sujeto se predecirá por ser no sensible al tratamiento con el compuesto FGF-18 si tiene el genotipo G/G IL-1RN rs9005 junto con T/T IL-1RN rs315952. Por el contrario, el sujeto se predecirá ser súper sensible (o muy sensible) al tratamiento con el compuesto de FGF-18 si tiene el genotipo A/G o A/A IL-1RN rs9005 junto con T/C o C/C IL-1RN rs315952. En cualquier otro caso, el paciente se predecirá ser sensible intermedio al tratamiento con el compuesto FGF-18 (véase la Tabla 22 para un resumen de los resultados clínicos y de las opciones terapéuticas potenciales).

La presente invención se dirige, por otra parte, a un método para predecir la sensibilidad al tratamiento con un compuesto de FGF-18 en un sujeto que tiene un trastorno del cartílago, comprendiendo el método las etapas de:

- a. Determinar el genotipo tanto de IL-1RN rs9005 como de IL-1RN rs315952;
- b. Predecir a partir del resultado de la etapa a, la sensibilidad alta, intermedia, baja o nula de dicho sujeto, al tratamiento con un compuesto de FGF-18.

Antes de determinar el genotipo en un locus, es necesario obtener una muestra de ácido nucleico de dicho sujeto, por ejemplo, mediante recogida de sangre o saliva. Preferiblemente, la muestra de ácido nucleico es una muestra de ADN. Por tanto, la presente invención se dirige a un método para predecir la sensibilidad al tratamiento con un compuesto de FGF-18 en un sujeto que tiene un trastorno del cartílago, comprendiendo el método las etapas de:

- a. Obtener una muestra de ácido nucleico de dicho sujeto;

- b. Determinar, a partir de la muestra de ácido nucleico, el genotipo tanto de IL-1RN rs9005 como de IL-1RN rs315952;
- c. Predecir a partir del resultado de la etapa b, la probabilidad de una sensibilidad alta, baja o nula del sujeto, al tratamiento con un compuesto de FGF-18.

5 Según dicho método, la presencia del genotipo G/G en IL-1RN rs9005 y T/T en IL-1RN rs315952 es predictivo de ausencia de, o baja, respuesta al tratamiento con un compuesto de FGF-18. El paciente, por tanto, se predecirá ser no sensible. Por el contrario, la presencia del genotipo A/G o A/A en IL-1RN rs9005 y T/C o C/C en IL-1RN rs315952 es predictivo de alta respuesta al tratamiento con un compuesto de FGF-18. El paciente, por tanto, se predecirá ser súper sensible. Se deduce que los sujetos que tienen cualquier otro genotipo en estos locus (es decir, G/G en IL-1RN rs9005 y T/C o C/C en IL-1RN rs315952 o A/G o A/A en IL-1RN rs9005 y T/T en IL-1RN 315952) se clasificarán por tener sensibilidad intermedia al tratamiento con un compuesto de FGF-18. De dicha predicción, el médico puede seleccionar fácilmente sólo a aquellos pacientes que se predicen que son sensibles al tratamiento con un compuesto de FGF-18, incluyendo tanto a los sujetos sensibles intermedios como a los súper sensibles.

15 La presente divulgación se refiere también a un ensayo para determinar la sensibilidad al tratamiento con un compuesto de FGF-18 o para determinar un régimen de tratamiento con un compuesto de FGF-18, comprendiendo el ensayo: (a) someter una muestra de ensayo de un sujeto humano, diagnosticado por tener un trastorno del cartílago, a al menos un ensayo de genotipado que determine los genotipos de al menos dos locus, en donde dichos al menos dos locus son: (i) SNP1 y (ii) SNP2, (b) determinar los genotipos de dichos al menos dos locus; (c) seleccionar un paciente por ser sensible a un tratamiento con un compuesto de FGF-18 cuando se determina por presentar al menos una de las siguientes combinaciones de SNPs: (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de SEQ ID NO:7; o (ii) SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T en el complemento de la SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7, o (iii) SNP1 genotipo A/G o A/A, o T/C o T/T en el complemento de SEQ ID NO:6 y SNP2 genotipo T/C o C/C, o A/G o G/G en el complemento de SEQ ID NO:7 y (d) tratar opcionalmente al paciente seleccionado en la etapa (c) con un compuesto de FGF-18.

Cuando el ensayo anterior se realiza para determinar un régimen de tratamiento con un compuesto de FGF-18, la etapa (c) es opcional, mientras que la etapa (d) se realiza, o se realiza preferiblemente.

30 La presente divulgación se refiere además a un ensayo para determinar la no sensibilidad al tratamiento con un compuesto de FGF-18, comprendiendo el ensayo: (a) someter una muestra de ensayo de un sujeto humano, diagnosticado por tener un trastorno del cartílago, a al menos un ensayo de genotipado que determine los genotipos de al menos dos locus, en donde dichos al menos dos locus son: (i) SNP1 y (ii) SNP2, (b) determinar los genotipos de dichos al menos dos locus; (c) seleccionar un paciente por ser no sensible a un tratamiento con un compuesto de FGF-18 cuando se determina por presentar al menos una de las siguientes combinaciones de SNPs: SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/T o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7, y (d) tratar opcionalmente al paciente seleccionado en la etapa (c) con un compuesto terapéutico diferente a un compuesto de FGF-18.

Antes de determinar el genotipo en un locus, en los ensayos descritos anteriormente, es necesario obtener una muestra (o ensayo) de ácido nucleico de dicho sujeto, por ejemplo, mediante recogida de sangre o saliva.

40 La presente solicitud abarca también un método para seleccionar pacientes que tienen un trastorno del cartílago para su inclusión o exclusión en un tratamiento, o ensayo clínico, con un compuesto de FGF-18, en base a la probabilidad de su respuesta a dicho tratamiento, comprendiendo:

- a. Determinar, a partir de una muestra de ácido nucleico, el genotipo de ambos locus IL-1RN rs9005 y IL-1RN rs315952, en donde el genotipo del paciente con respecto a dicho locus es predictivo acerca del riesgo de un paciente de ser sensible o no sensible a dicho tratamiento, y
- 45 b. Seleccionar los pacientes que son adecuados para dicho tratamiento o ensayo clínico, es decir, seleccionar los pacientes sensibles que son adecuados para dicho tratamiento o dicho ensayo clínico.

50 Antes de determinar el genotipo en un locus, es necesario obtener una muestra de ácido nucleico de dicho sujeto, por ejemplo, mediante recogida de sangre o saliva. Preferiblemente, la muestra de ácido nucleico es una muestra de ADN. Por tanto, la presente invención se dirige a la solicitud presente que abarca un método para seleccionar pacientes que tienen un trastorno del cartílago para su inclusión o exclusión en un tratamiento, o ensayo clínico, con un compuesto de FGF-18, en base a la probabilidad de su respuesta a dicho tratamiento o ensayo clínico, comprendiendo:

- a. Obtener una muestra de ácido nucleico de dicho sujeto,
- 55 b. Determinar, a partir de la muestra de ácido nucleico, el genotipo de ambos locus IL-1RN rs9005 y IL-1RN rs315952, en donde el genotipo del paciente con respecto a dicho locus es predictivo acerca del riesgo de un paciente de ser sensible o no sensible a dicho tratamiento, y

- c. Seleccionar los pacientes que son adecuados para dicho tratamiento o dicho ensayo clínico, es decir, seleccionar los pacientes sensibles que son adecuados para dicho tratamiento o dicho ensayo clínico.

Según dicho método, los pacientes que tienen el genotipo G/G IL-1RN rs9005 y T/T IL-1RN rs315952, que son predictivos de ser no sensibles, preferiblemente se excluyen del tratamiento con un compuesto de FGF-18, o de un ensayo clínico relacionado con un compuesto de FGF-18. Los otros pacientes, los sensibles (incluyendo tanto a los sensibles intermedios como a los súper sensibles; es decir, los pacientes que tienen el genotipo G/G en IL-1RN rs9005 y T/C o C/C en IL-1RN rs315952 o A/G o A/A en IL-1RN rs9005 y T/T, T/C o C/C en IL-1RN rs315952), se pueden seleccionar, como adecuados para el tratamiento con un compuesto de FGF-18, tal como esprifermina.

Alternativamente, el método para seleccionar a un paciente que tiene un trastorno del cartílago para su inclusión o exclusión en un tratamiento o ensayo clínico con un compuesto de FGF-18 en base a la posibilidad de la sensibilidad del paciente a dicho compuesto de FGF-18, comprende las etapas de: (a) someter a una muestra de ensayo de un sujeto humano, que se ha diagnosticado que tiene un trastorno del cartílago, a al menos un ensayo de genotipado adaptado a determinar los genotipos de al menos dos locus, en donde dichos al menos dos locus son: (i) SNP1 SNP2, en donde SNP2 está en la posición 27 de SEQ ID NO:7 identificado por rs315952, en donde SEQ ID NO:7 es una parte de la secuencia de ácidos nucleicos del genoma del antagonista del receptor de interleuquina 1 (IL-1RN); y (b) detectar a partir de los genotipos de dichos al menos dos locus, la presencia de una combinación del genotipo seleccionado de: (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GC en el complemento de SEQ ID NO:7; o (ii) SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7; o (iii) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6, y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7; y (c) seleccionar un paciente para la inclusión en un tratamiento o ensayo clínico con un compuesto de FGF-18 cuando se detectan las condiciones (i) o (ii) en base al reconocimiento de que las combinaciones del genotipo (i) y (ii) se asocian con una respuesta a dicho compuesto de FGF-18, y excluyendo al paciente del tratamiento o ensayo clínico con un compuesto de FGF-18 cuando se detecta la condición (iii) en base al reconocimiento de que la combinación del genotipo (iii) se asocia con una respuesta inadecuada al tratamiento con dicho compuesto de FGF-18.

El método para seleccionar un sujeto humano para un ensayo clínico para ensayar un compuesto de FGF-18, puede comprender alternativamente las etapas de: (a) ensayar una muestra biológica a partir de un sujeto humano diagnosticado con un trastorno del cartílago para al menos los siguientes dos polimorfismos de un solo nucleótido: (i) SNP1 y (ii) SNP2, (b) determinar los genotipos de los SNPs; (c) seleccionar para el ensayo clínico el sujeto humano que tiene los siguientes genotipos en dichos SNPs: (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de SEQ ID NO:7; o (ii) SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7; o (iii) un sujeto humano que no tiene el SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6 y el SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7.

La presente invención describe también un método para excluir un sujeto humano de un ensayo clínico para ensayar un compuesto de FGF-18, comprendiendo el método las etapas de: (a) ensayar una muestra biológica de un sujeto humano diagnosticado con un trastorno del cartílago para al menos los dos siguientes polimorfismos de un solo nucleótido: (i) SNP1 y (ii) SNP2; (b) determinar los genotipos de los SNPs; (c) excluir del ensayo clínico el sujeto humano que tiene el siguiente genotipo en dichos SNPs: SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6 y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7; o excluyendo del ensayo clínico el sujeto humano que tampoco tenga los siguientes genotipos del SNP: (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de SEQ ID NO:7; o (ii) SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7.

Además del descubrimiento de que el sujeto se puede clasificar como súper sensible, sensible o no, en función de su genotipo, se encontró que sorprendentemente el mismo genotipo también predecía los efectos adversos, tales como los AIRs. De hecho, otras investigaciones y análisis de los polimorfismos SNP demostraron una relación entre los marcadores de rs9005 y rs315952, en combinación, con efectos adversos clínicos, con datos MRI con respecto al beneficio estructural y con respecto al beneficio sintomático, como se determinó utilizando el cuestionario WOMAC. Estos SNPs se pueden emplear no sólo como herramienta predictiva de la respuesta de un paciente a un tratamiento con un compuesto de FGF-18 a nivel del volumen del cartílago, sino que también se pueden emplear como una herramienta predictiva de su riesgo a desarrollar efectos adversos, tales como AIRs. Por tanto, el perfil: "beneficio estructural frente a efectos adversos potenciales" de la terapia con FGF-18 podría ser útil para determinar una mejor relación beneficio/riesgo, es decir, mejor resultado con menor riesgo de efectos adversos para los pacientes.

No cabe duda en base al resultado de que los pacientes que son súper sensibles tienen mayores puntuaciones WOMAC y mayor probabilidad de tener un acontecimiento AIR, especialmente cuando el compuesto de FGF-18 se usa, por ejemplo, en una dosis de 100 mcg, en comparación con los pacientes tratados con el placebo. De manera similar, los pacientes no sensibles tienen también puntuaciones WOMAC altas, a cualquier dosis, en comparación con los pacientes tratados con el placebo. Se ha demostrado también que al contrario de los resultados a una dosis de 100 mcg, los pacientes súper sensibles tratados con el compuesto de FGF-18 a una dosis más baja, por ejemplo

30 mcg, tienen menores puntuaciones WOMAC (es decir, una mejora WOMAC) y menor probabilidad de tener un efecto AIR. En vista de estos resultados, puede ser útil seleccionar a los pacientes en base a su probabilidad para responder/o no responder al tratamiento con el compuesto de FGF-18 en combinación con su nivel de riesgo para presentar efectos adversos: los pacientes no sensibles se podrían excluir de un tratamiento que es probable que no funcione con ellos (véase el método de selección anterior), y los pacientes súper sensibles se pueden someter a un régimen de tratamiento alternativo.

La presente invención se dirige, por tanto, a un método para seleccionar pacientes que tienen un trastorno del cartílago, para una régimen terapéutico alternativo con un compuesto de FGF-18, en base a su probabilidad de ser súper sensibles al tratamiento con el compuesto de FGF-18, que comprende identificar el ácido nucleico del paciente en ambos locus polimórficos seleccionados del grupo que consiste en IL-1RN rs9005 y IL-1RN rs315952, en donde el genotipo del paciente con respecto a dicho locus es predictivo acerca del riesgo del sujeto de ser súper sensible a un tratamiento con dicho compuesto de FGF-18, y permite la selección de dicho paciente para un régimen terapéutico alternativo que será adecuado para dicho paciente, en el que la dosis del compuesto de FGF-18 que se administra en el régimen terapéutico alternativo se reduce en comparación con la dosis del compuesto de FGF-18 que se administra al paciente que se predice que es sensible pero no súper sensible al tratamiento con dicho compuesto de FGF-18.

Se describe también en la presente memoria un método para seleccionar un paciente que tiene un trastorno del cartílago para un régimen de tratamiento modificado con el compuesto de FGF-18, en base a la probabilidad de dicho paciente de tener efectos de Reacción Inflamatoria Aguda (AIR) cuando se trata con dicho compuesto, comprendiendo el método las etapas de (a) detectar a partir de la muestra de ácido nucleico obtenida del paciente, el genotipo de (i) SNP1 y (ii) SNP2; y (b) seleccionar un régimen de tratamiento modificado para un paciente cuando se detecta una combinación de SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7.

Por consiguiente, los pacientes que tienen el genotipo A/G o A/A IL-1RN rs9005 y T/C o C/C IL-1RN rs315952, que se predicen por ser súper sensibles, se seleccionan preferiblemente para un régimen terapéutico alternativo en el que se reduce una de las dosis a administrar del compuesto de FGF-18.

Se describe también en la presente memoria un método para seleccionar pacientes que tienen un trastorno del cartílago para un régimen terapéutico alternativo con el compuesto de FGF-18, en base a su probabilidad de tener efectos AIR cuando se trata con un compuesto de FGF-18, comprendiendo determinar, a partir de una muestra de ácido nucleico, el genotipo de ambos locus IL-1RN rs9005 y IL-1RN rs315952, en donde el genotipo del paciente con respecto a dicho locus es predictivo del riesgo del paciente para desarrollar efectos AIR en respuesta al tratamiento con dicho compuesto de FGF-18, y permite la selección de dicho paciente para un régimen terapéutico alternativo que será adecuado para dicho paciente, en el que la dosis del compuesto de FGF-18 que se administra en el régimen terapéutico alternativo se reduce en comparación con la dosis del compuesto de FGF-18 que se administra al paciente que (1) se predice que es sensible y (2) no presenta riesgo a desarrollar efectos AIR.

Por consiguiente, los pacientes que tienen el genotipo A/G o A/A en IL-1RN rs9005 y T/C o C/C en IL-1RN rs315952, que se predicen por ser súper sensibles, se seleccionan preferiblemente para un régimen terapéutico alternativo en el que se reduce una de las dosis a administrar del compuesto de FGF-18, en comparación con el régimen terapéutico normal, es decir, para un paciente que se predice que es sensible para el tratamiento con un compuesto de FGF-18 pero que no presenta riesgo de desarrollar efectos AIR.

El compuesto de FGF-18 se administra normalmente por vía intra-articular a una dosis de 100 mcg por inyección, una vez a la semana durante 3 semanas por ciclo de tratamiento. En vista de los buenos resultados a 30 mcg para los pacientes súper sensibles (véanse los ejemplos), un régimen de dosificación alternativo propuesto para estos pacientes que se predicen ser súper sensibles, el compuesto de FGF-18 se administra por vía intra-articular a una dosis de 30 mcg por inyección, una vez a la semana durante 3 semanas por ciclo de tratamiento. Se entiende que aunque en aquel momento, la dosis preferida era de 100 mcg por inyección, se redujo posiblemente a 30 mcg por inyección para sujetos súper sensibles, la presente invención no se limita a dichas dosificaciones. Por otra parte, el compuesto de FGF-18 se puede administrar por vía intra-articular a una dosis comprendida entre 50 y 300 mcg por inyección, preferiblemente entre 60 y 250 mcg, o incluso preferiblemente entre 100 y 200 mcg. Para pacientes súper sensibles, dicha dosis se podría reducir, por ejemplo hasta 1/2 ó 1/3.

La presente divulgación abarca además un compuesto de FGF-18 para usar en el tratamiento de un paciente que tiene un trastorno del cartílago, caracterizado en que el paciente tiene cualquier combinación del genotipo o genotipos que se seleccionan del grupo que consiste en: (1) G/G IL-1RN rs9005 y T/C o C/C IL-1RN rs315952, o (2) A/G IL-1RN rs9005 y T/T, T/C o C/C IL-1RN rs315952. Además, un paciente que tiene al menos un alelo A de IL-1RN rs9005 y al menos un alelo C de T/T IL-1RN rs315952 es apto para el tratamiento con un compuesto de FGF-18 a una dosis menor. Se deduce que un paciente que no cumple estos criterios (es decir, con genotipo G/G IL-1RN rs9005 y T/T IL-1RN rs315952) se excluye preferiblemente del tratamiento con el compuesto de FGF-18 (véase la Tabla 22).

Se divulga también un ensayo para seleccionar un régimen de tratamiento para un sujeto humano con un trastorno

del cartílago, comprendiendo el ensayo: (a) someter una muestra de ensayo del sujeto humano, que se ha diagnosticada por tener un trastorno del cartílago, a al menos un ensayo de genotipado que determine los genotipos de al menos dos locus, en donde dichos al menos dos locus son: (i) SNP1 y (ii) SNP2; (b) detectar a partir de los genotipos de dichos al menos dos locus, la presencia de una combinación del genotipo seleccionado de: (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o G/G en el complemento de SEQ ID NO:7; o (ii) SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7; o (iii) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6, y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7; y (c) seleccionar, y opcionalmente administrar, un régimen de tratamiento que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de FGF-18 cuando se detectan las condiciones (i) o (ii) en base al reconocimiento de que las combinaciones del genotipo (i) y (ii) se asocian con una respuesta a dicho compuesto, y excluyendo del régimen de tratamiento que comprende dicho compuesto cuando se detecta la condición (iii) en base al reconocimiento de que la combinación del genotipo (iii) se asocia con una respuesta inadecuada al tratamiento con dicho compuesto.

Se divulga también un método para tratar a un sujeto humano con un trastorno del cartílago, que comprende administrar una composición que comprende una cantidad eficaz del compuesto de FGF-18 a un sujeto humano, al que se diagnostica de tener un trastorno del cartílago, y al que además se ha determinado que tiene la combinación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) seleccionada de: SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6, en donde SNP1 está en posición X de SEQ ID NO:6 identificado por rs9007, en donde SEQ ID NO:6 es una parte de la secuencia de ácido nucleico genómico del antagonista del receptor de interleuquina 1 (IL-1RN); y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de SEQ ID NO:7; o (ii) SNP1 genotipo A/G o AA, T/C o T/T en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7, en donde SNP2 está en posición X de SEQ ID NO:7 identificado por rs317972, en donde SEQ ID NO:7 es una parte de la secuencia de ácido nucleico genómico del antagonista del receptor de interleuquina 1 (IL-1RN).

Se divulga además un método para tratar un sujeto humano con un trastorno del cartílago, que comprende (a) ensayar una muestra biológica de un sujeto, que se diagnostica de tener el trastorno del cartílago para al menos los siguientes dos locus SNP: (i) SNP1, y (ii) SNP2; y (b) administrar un régimen de tratamiento que comprende una composición que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de FGF-18 al sujeto si se detecta una de las siguientes condiciones: (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de SEQ ID NO:7; o (ii) SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7.

Alternativamente, el método para tratar un sujeto humano con un trastorno del cartílago, comprende las etapas de: (a) ensayar una muestra biológica de un sujeto, que se diagnostica de tener el trastorno del cartílago para al menos los siguientes dos locus SNP: (i) SNP1, y (ii) SNP2; y (b) administrar un régimen de tratamiento que comprende una composición que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de FGF-18 al sujeto si no se detecta SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6, y SNP2 genotipo T/T o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7.

Se divulga también el método para seleccionar en un sujeto que tiene un trastorno del cartílago, en donde dicho trastorno del cartílago es susceptible del tratamiento con un compuesto de FGF-18, comprende:

(a) obtener una muestra biológica a partir del sujeto con un trastorno del cartílago con el objetivo de determinar si el trastorno del cartílago en el sujeto es susceptible del tratamiento con dicho compuesto de FGF-18;

(b) poner en contacto la muestra biológica con al menos dos nucleótidos capaces de demostrar si la muestra biológica comprende o no la combinación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) seleccionados de (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6, y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de SEQ ID NO:7; o (ii) SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7;

(c) identificar el trastorno del cartílago en el sujeto como susceptible para el tratamiento con dicho compuesto de FGF-18 cuando en la muestra biológica se detecta cualquiera de las combinaciones de (i) o (ii) e identificar el trastorno del cartílago en el sujeto como de pobre respuesta o sin respuesta para el tratamiento con dicho compuesto cuando en la muestra biológica no se detecta ninguna de las combinaciones de (i) o (ii).

En la presente memoria se describe también un método para seleccionar un régimen de tratamiento para un sujeto con un trastorno de un cartílago, que comprende: (a) obtener una muestra de ensayo del sujeto humano diagnosticado por tener depresión; (b) someter la muestra de ensayo a al menos un análisis para determinar los parámetros de al menos dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), en donde al menos los dos SNPs comprenden lo siguiente: (i) SNP1, y (ii) SNP2, (c) detectar utilizando los SNPs, la presencia de al menos una de las siguientes condiciones o combinaciones de las mismas: (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de SEQ ID NO:7; o (ii) SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7; o (iii) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6 y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7; (d) proporcionar un resultado si se detecta al menos una de las condiciones y

cuando se detecta la condición (i) o (ii) a partir de la muestra de ensayo, después seleccionar al sujeto humano y opcionalmente administrar un régimen de tratamiento que comprende un compuesto de FGF-18, y cuando se detecta la condición (iii), no seleccionar o administrar al sujeto humano un régimen de tratamiento que comprende dicho compuesto.

5 En los métodos y ensayos anteriormente mencionados, los pacientes que tienen el genotipo A/G o A/A en IL-1RN rs9007 (SNP1) y T/C o C/C en IL-1RN rs317972 (SNP2), que se predicen que son súper sensibles, se seleccionan preferiblemente para un régimen terapéutico alternativo, en el que se reduce una de las dosis a administrar del compuesto de FGF-18, en comparación con el régimen terapéutico normal, es decir, para un paciente que se predice que es sensible para el tratamiento con un compuesto de FGF-18 pero que no presenta riesgo de desarrollar efectos AIR.

10 En otras realizaciones de la divulgación, se proporcionan también sistemas (y datos legibles por ordenador para sistemas informáticos) para obtener datos. Dichos datos se pueden usar especialmente para valorar de forma adecuada el tratamiento con un compuesto de FGF-18 en un sujeto, para evaluar el riesgo del sujeto de desarrollar AIR cuando se trata con un compuesto de FGF-18, o para controlar la eficacia del tratamiento con un compuesto de FGF-18 en un sujeto. Dichos sistemas se pueden usar durante los ensayos clínicos, cuando se tiene que preveer un tratamiento con un compuesto de FGF-18 o cuando ya ha comenzado un tratamiento con dicho compuesto.

15 Por otra parte, en la presente memoria se incluye un sistema informático para obtener datos a partir de al menos una muestra de ensayo obtenida a partir de al menos un sujeto con un trastorno del cartílago, comprendiendo el sistema: (a) al menos un módulo de determinación configurado para recibir al menos dicha muestra de ensayo y realizar al menos un análisis sobre al menos dicha muestra de ensayo para determinar la presencia o ausencia de las siguientes condiciones: (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6, y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de SEQ ID NO:7; o (ii) SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7; o (iii) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6, y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7; (b) al menos un dispositivo de almacenamiento configurado para almacenar los datos de salida a partir de dicho módulo de determinación; y (c) al menos un módulo de visualización para mostrar un contenido basado en parte de los datos de salida de dicho módulo de determinación, en donde el contenido comprende una señal indicativa de la presencia de al menos una de estas condiciones, y opcionalmente la ausencia de cualquiera de estas condiciones.

20 Se divulga también un sistema informático para obtener datos a partir de al menos una muestra de ensayo obtenida a partir de al menos un sujeto, comprendiendo el sistema: (a) un módulo de determinación configurado para recibir al menos dicha muestra de ensayo y realizar al menos un análisis de genotipado sobre al menos dicha muestra de ensayo para determinar los genotipos de al menos dos locus, en donde dichos al menos dos locus comprenden: (i) SNP1, y (ii) SNP2, (b) un dispositivo de almacenamiento configurado para almacenar los datos de salida de dicho módulo de determinación; (c) un módulo informático que comprende instrucciones programadas específicamente para determinar a partir de los datos de salida la presencia de cualquiera de las combinaciones de los polimorfismos seleccionados a partir de los siguientes: (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de SEQ ID NO:7; o (ii) SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T en el complemento de SEQ ID NO:6; y genotipo SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7; o (iii) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6, y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7; y (d) un módulo de visualización para mostrar un contenido basado en parte de los datos de salida de dicho módulo informático, en donde el contenido comprende una señal indicativa de la presencia de la combinación (i), (ii), o (iii) de los SNPs, y opcionalmente la ausencia de una o más de las combinaciones (i), (ii), y (iii) de los SNPs.

25 El medio legible por ordenador puede tener instrucciones legibles informáticas grabadas al respecto para definir los módulos del programa informático para poner en práctica un método en el ordenador. En tal caso, dicho medio de almacenamiento legible por ordenador puede comprender: (a) instrucciones para comparar los datos almacenados en un dispositivo de almacenamiento con datos de referencia para proporcionar un resultado de comparación, en donde la comparación identifica la presencia o ausencia de al menos una de las siguientes condiciones: (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de SEQ ID NO:7; o (ii) SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7; o (iii) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6, y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7; y (b) instrucciones para visualizar un contenido basado en parte de los datos de salida de módulo de determinación, en donde el contenido comprende una señal indicativa de la presencia de al menos una de las condiciones, y opcionalmente la ausencia de una o más de las condiciones.

30 El medio de almacenamiento legible por ordenador puede ser cualquier medio tangible disponible al que se puede acceder por ordenador. El medio de almacenamiento legible por ordenador incluye medios tangibles volátiles y no volátiles, extraíbles o no extraíbles aplicados en cualquier método o tecnología para almacenar información, tal como las instrucciones legibles por ordenador, estructuras de datos, módulos del programa u otros datos. Los medios de almacenamiento legibles por ordenador incluyen, pero no se limitan a, memoria RAM (memoria de acceso aleatorio), ROM (memoria sólo de lectura), EPROM (memoria sólo de lectura programable borrable), EEPROM (memoria sólo

de lectura programable borrable eléctricamente), memoria flash u otra tecnología de memoria, CD-ROM (memoria sólo de lectura en disco compacto), DVDs (discos versátiles digitales) u otros medios de almacenamiento óptico, casetes magnéticos, cintas magnéticas, almacenamiento de disco magnético u otros medios de almacenamiento magnético, otros tipos de memoria volátil y no volátil, y cualquier otro medio tangible que se pueda utilizar para almacenar la información deseada y a la que se pueda acceder mediante un ordenador que incluye cualquier combinación adecuada de las anteriores.

Datos legibles por ordenador que se incorporan en uno o más de los medios legibles por ordenador pueden definir las instrucciones, por ejemplo, como parte de uno o más programas que, como resultado de ejecutarse mediante un ordenador, dan instrucciones al ordenador para realizar una o más de las funciones descritas en la presente memoria, y/o varias realizaciones, variaciones y combinaciones de las mismas. Tales instrucciones se pueden escribir en cualquiera de los lenguajes de programación, por ejemplo, Java, J#, Visual Basic, C, C#, C++, Fortran, Pascal, Eiffel, Basic, lenguaje de la asamblea COBOL, y similares, o cualquier variedad de combinaciones de los mismos. El medio legible por ordenador en el que se incorporan tales instrucciones puede residir en uno o más de los componentes de cualquier sistema, o un medio de almacenamiento legible por ordenador descrito en la presente memoria, se puede distribuir a lo largo de uno o más de tales componentes. El medio legible por ordenador se puede transportar, tal que las instrucciones almacenadas al respecto se pueden cargar en cualquier fuente informática para aplicar los aspectos de la presente invención discutidos en la presente memoria.

La información determinada en el módulo de determinación se puede leer mediante el dispositivo de almacenamiento. El dispositivo de almacenamiento se adapta o configura para tener registro de la información del nivel proteico o del nivel de expresión al respecto. Tal información se puede proporcionar en forma digital que se puede transmitir y leer electrónicamente, por ejemplo, a través de internet, en un disquete, a través de USB (bus universal en serie) o a través de cualquier otro modo de comunicación adecuado.

En el contexto de la presente invención como conjunto, por ejemplo, en el contexto de cualquiera de los métodos, usos, o ensayos según la presente invención, el compuesto de FGF-18 preferido es un FGF-18 truncado, tal como esprifermina, y el trastorno del cartílago preferido se selecciona del grupo que consiste en osteoartritis, lesión del cartílago, fracturas que afectan al cartílago de la articulación o procedimientos quirúrgicos con impacto sobre el cartílago de la articulación, tal como microfractura.

Se entiende que en el contexto de la presente invención como un conjunto, por ejemplo, mediante cualquiera de los métodos, usos, o ensayos según la presente invención, antes de determinar el genotipo en un locus, es necesario obtener una muestra de ácido nucleico (o una muestra de ensayo) de un sujeto, por ejemplo, mediante recogida de sangre o saliva. Preferiblemente, la muestra de ácido nucleico es una muestra de ADN.

Un individuo afectado con un trastorno del cartílago y que se va a ensayar, ensayar y/o tratar según cualquiera de los métodos, es un usuario de los ensayos descritos en la presente memoria, es un sujeto humano que es candidato del tratamiento con un compuesto de FGF-18, tal como esprifermina. En una realización preferida, el individuo se ha diagnosticado con el trastorno del cartílago, o muestra un síntoma de trastorno del cartílago.

Se entenderá también que en el contexto de la invención como un conjunto, la determinación se puede realizar en la secuencia complementaria de IL-1RN rs9005 y IL-1RN rs315952. Se deduce de este modo que según la presente invención como un conjunto, por ejemplo, en el contexto de cualquiera de los métodos, usos, o ensayos según la presente invención, la presencia del genotipo C/C en la secuencia complementaria a IL-1RN rs9005 y A/A en la secuencia complementaria de IL-1RN rs315952 es predictivo de una respuesta nula o una respuesta baja (es decir, sin sensibilidad) al tratamiento con un compuesto de FGF-18. Por el contrario, la presencia del genotipo T/C o T/T en la secuencia complementaria a IL-1RN rs9005 y A/G o G/G en la secuencia complementaria de IL-1RN rs315952 es predictivo de una respuesta alta (alta sensibilidad) al tratamiento con un compuesto de FGF-18. Dicho genotipo será también un marcador de probabilidad para un paciente de desarrollar efectos AIR cuando se trata con dicho compuesto de FGF-18. Los otros genotipos en estos locus son predictivos de sensibilidad intermedia (es decir, C/C en el complemento de IL-1RN rs9005 y A/G o G/G en el complemento de IL-1RN rs315952 o T/C o T/T en el complemento de IL-1RN rs9005 y A/A en el complemento de IL-1RN rs315952).

La presente divulgación abarca un kit que comprende los medios para realizar los métodos descritos anteriormente y las instrucciones de uso, en donde dicho kit comprende al menos un par de cebadores o sondas específicos para detectar la presencia o ausencia de los alelos en el locus IL-1RN rs9005 y IL-1RN rs315952.

El kit puede comprender una serie de oligonucleótidos fijados a una pluralidad de sondas oligonucleótidas que detectan no más de 20 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), dichos SNPs comprenden: (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de SEQ ID NO:7; o (ii) SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T en el complemento de la SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7; o (iii) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/T o A/A, en el complemento de SEQ ID NO:7; un recipiente opcional que contiene un marcador detectable para conjugarse a una molécula de nucleótidos derivada de una muestra de ensayo de un sujeto diagnosticado por tener un trastorno del cartílago; y al menos un reactivo.

Alternativamente, la serie de oligonucleótidos fijados a una pluralidad de sondas oligonucleótidas detecta no más de 17 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), no más de 10 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) o no más de 7 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs).

5 Se describe también un kit que comprende: una pluralidad de cebadores oligonucleótidos o de un conjunto de cebadores que se unen para detectar no más de un alelo específico de no más de 20 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), en donde cada subconjunto de cebadores oligonucleótidos que se unen a un alelo específico de un SNP se marca con un marcador distinto, y en donde dichos SNPs comprenden los siguientes SNPs: (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de SEQ ID NO:7; o (ii) SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T en el complemento de la SEQ ID NO:6; y
10 SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7; o (iii) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/T o A/A, en el complemento de SEQ ID NO:7; y al menos un reactivo.

Alternativamente, la pluralidad de cebadores oligonucleótidos o de un conjunto de cebadores que se unen para detectar no más de un alelo específico de no más de 17 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), o no más de un alelo específico de no más de 10 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) o no más de un alelo específico de
15 no más de 7 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs).

Se describe también un kit para seleccionar un régimen de tratamiento para un sujeto con un trastorno del cartílago, que comprende al menos un reactivo para determinar en una muestra de ensayo de un sujeto humano diagnosticado por tener el trastorno del cartílago, la presencia o ausencia de los siguientes SNPs: (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de
20 SEQ ID NO:7; o (ii) SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T en el complemento de la SEQ ID NO:6; y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de SEQ ID NO:7; o (iii) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de SEQ ID NO:6, y SNP2 genotipo T/T o A/A, en el complemento de SEQ ID NO:7.

Normalmente, los oligonucleótidos en el kit son bien sondas alelo-específicas o bien cebadores alelo-específicos. En algunas realizaciones, el kit comprende oligonucleótidos iniciadores de la extensión. En otras realizaciones, el conjunto de oligonucleótidos es una combinación de sondas alelo-específicas, cebadores alelo-específicos, u oligonucleótidos iniciadores de la extensión.
25

La composición y longitud de cada oligonucleótido en un kit de la invención dependerá de la naturaleza de la región genómica que contiene el marcador genético de la invención, así como del tipo de ensayo a realizar con el oligonucleótido y se determina fácilmente por el experto en la técnica. Por ejemplo, el polinucleótido que se usa en el ensayo puede constituir un producto de amplificación, y por tanto, la especificidad requerida del oligonucleótido es con respecto a la hibridación a la región diana en el producto de amplificación en vez de al ADN genómico aislado del individuo.
30

Normalmente, cada oligonucleótido en el kit es un complemento perfecto de su región diana. Se dice que un oligonucleótido es un complemento "perfecto" o "completo" de otra molécula de ácido nucleico si cada nucleótido de una de las moléculas es complementario del nucleótido en la posición correspondiente a la de la otra molécula. Aunque para detectar polimorfismos se prefiere la complementariedad perfecta de los oligonucleótidos, se contemplan desviaciones de la complementariedad completa, donde tales desviaciones no evitan que la molécula hibride específicamente a la región diana como se define anteriormente. Por ejemplo, un cebador oligonucleótido puede tener un fragmento no complementario en su extremo 5', con el resto del cebador siendo completamente complementario a la región diana. Alternativamente, los nucleótidos no complementarios pueden estar intercalados en la sonda o el cebador siempre y cuando la sonda o cebador resultante sea aún capaz de hibridarse específicamente a la región diana.
35
40

En algunas realizaciones, cada oligonucleótido en el kit hibrida específicamente con su región diana bajo estrictas condiciones de hibridación. Las estrictas condiciones de hibridación son dependientes de la secuencia y varían dependiendo de las circunstancias. Generalmente, las estrictas condiciones se seleccionan por ser aproximadamente 5°C más bajas que el punto térmico de fusión (T_m) para la secuencia específica a una longitud iónica y pH determinados. El T_m es la temperatura (bajo longitud iónica, pH, y concentración de ácido nucleico determinados) a la que el 50% de las sondas complementarias a la secuencia diana hibridan a la secuencia diana en equilibrio. Como la secuencia diana esta generalmente presente en exceso, en el T_m el 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio. Normalmente, las estrictas condiciones incluyen una concentración salina de al menos aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración iónica de sodio (u otras sales) de pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 25°C para sondas de oligonucleótidos cortos (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos). Las estrictas condiciones se pueden alcanzar con la adición de agentes estabilizantes, tal como formamida. Por ejemplo, son adecuadas para hibridaciones de sonda alelo-específica condiciones de 5 x SSPE (NaCl 750 mM, fosfato de sodio 50 mM, EDTA 5 mM, pH 7,4) y una temperatura de 25-30°C.
45
50
55

En los kits de la divulgación los oligonucleótidos pueden estar compuestos de ribonucleótidos en cualquier estado de fosforilación, desoxirribonucleótidos, y derivados de nucleótidos acíclicos, y otros derivados equivalentes funcionalmente. Alternativamente, los oligonucleótidos pueden tener una estructura libre de fosfato, que se puede comprender de enlaces tales como carboximetilo, acetamida, carbamato, poliamida [ácido peptidonucleico (PNA)] y

similares. Los oligonucleótidos se pueden preparar mediante síntesis química empleando cualquier metodología adecuada conocida en la técnica, o pueden derivarse de una muestra biológica, por ejemplo, mediante restricción de la digestión. Los oligonucleótidos pueden contener un marcador detectable, según cualquier técnica conocida en la técnica, incluyendo el uso de radiomarcadores, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, proteínas, haptenos, anticuerpos, marcadores de secuencia, y similares. Los oligonucleótidos en el kit se pueden fabricar y comercializar como reactivos específicos del analito (ASRs) o pueden constituir componentes de un dispositivo de diagnóstico homologado.

Normalmente, el kit incluye un manual de instrucciones que describe las distintas formas en las que se puede usar el kit para detectar la presencia o ausencia de un marcador genético de la invención.

En alguna realización, el conjunto de oligonucleótidos en el kit son oligonucleótidos alelo-específicos. Como se emplea en la presente memoria, el término oligonucleótido alelo-específico (ASO) significa un oligonucleótido que es capaz, bajo condiciones lo suficientemente estrictas, de hibridar con un marcador genético de un alelo, en una región diana que contiene el marcador genético mientras que no hibrida la misma región que contiene un alelo diferente. Como se entiende por un experto en la técnica, la especificidad de alelo dependerá de una variedad de condiciones de exigencia fácilmente optimizadas, que incluye las concentraciones de sal y formamida, así como la temperatura tanto en la hibridación como en las etapas de lavado.

Normalmente, un gen ASO será perfectamente complementario a un alelo aunque contenga una sola desigualdad para otro alelo. En sondas ASO, la única desigualdad está preferiblemente dentro de una posición central de la sonda de oligonucleótidos pues se alinea con el marcador genético en la región diana (por ejemplo, aproximadamente la 7ª o 8ª posición en un 15mer, la 8ª o 9ª posición en un 16mer, y la 10ª o 11ª posición en un 20mer). La única desigualdad en cebadores ASO se localiza en el extremo 3' del nucleótido, o preferiblemente en el extremo 3' del penúltimo nucleótido. Las sondas y los cebadores ASO que hibridan a la hebra codificante o no codificante, se contemplan en la invención.

Normalmente, el kit comprende un par de oligonucleótidos alelo-específicos para un marcador genético a ensayar de la invención, con un miembro del par siendo específico para un alelo, y el otro miembro siendo específico para otro alelo. En tales realizaciones, el par de oligonucleótidos pueden tener diferentes longitudes o tener diferentes marcadores detectables para permitir al usuario del kit determinar qué oligonucleótido alelo-específico hibrida específicamente con la región diana, y por tanto, determina qué alelo está presente en el individuo para el locus marcador ensayado.

Normalmente, los oligonucleótidos en el kit son oligonucleótidos de extensión del cebador. Para terminar la extensión del oligonucleótido en el marcador genético de interés se eligen mezclas de terminación para la extensión mediada por polimerasa a partir de cualquiera de estos oligonucleótidos, o una base de los mismos, dependiendo de los nucleótidos alternativos presentes en el locus marcador.

Los métodos según la presente invención son útiles en aplicaciones de diagnóstico clínico. Sin embargo, como se emplea en la presente memoria, el término "diagnóstico" no se limita a los usos clínicos o médicos, y los métodos de diagnóstico de la invención reivindicados en la presente memoria son también útiles en cualquier aplicación de investigación, y durante ensayos clínicos, en los que es deseable ensayar un sujeto por la presencia o ausencia de cualquier marcador genético descrito en la presente memoria.

En el contexto de la invención, se puede detectar en un individuo la presencia o ausencia de un alelo o par de alelos particular en el locus de un marcador genético de la invención mediante cualquier técnica conocida per sé por el experto en la técnica, incluyendo la secuenciación, pirosecuenciación, hibridación selectiva, amplificación selectiva y/o espectrometría de masas que incluyen la espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz acoplado a un analizador del tiempo de vuelo (MS MALDI-TOF). En una realización particular, la alteración se detecta mediante amplificación de ácido nucleico selectivo empleando uno o varios cebadores específicos. La alteración se detecta mediante hibridación selectiva empleando una o varias sondas específicas.

Otras técnicas incluyen métodos de genotipado basados en electroforesis en gel, tales como PCR acoplado a análisis del polimorfismo en la longitud del fragmento de restricción (RFLP, de sus siglas en inglés), PCR múltiple, ensayo de ligación de oligonucleótidos, y minisequenciación; tecnologías de genotipado basado en tinte fluorescente, tales como ensayo de ligación de oligonucleótidos, pirosecuenciación, extensión de una sola base con detección de fluorescencia, hibridación en disolución homogénea, tal como TaqMan, y genotipado mediante balizas moleculares; tecnologías basadas en secuenciación, tales como la secuenciación de Sanger y plataformas de secuenciación de última generación; amplificación por círculo rodante y ensayos por rotura invasiva, así como microchips basados en chips de ADN y tecnologías de genotipado por espectrometría de masas. En la técnica se conocen métodos de análisis de la expresión proteica e incluyen la electroforesis en gel bidimensional, espectrometría de masas y microchips de anticuerpos. La secuenciación se puede llevar a cabo empleando técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo, empleando secuenciadores automáticos. La secuenciación se puede realizar sobre el gen completo o, más preferiblemente, sobre dominios específicos del mismo, normalmente sobre aquellos conocidos o sospechosos de tener mutaciones u otras alteraciones perjudiciales. La secuenciación se puede realizar según varias técnicas conocidas en la técnica, tales como la reacción en cadena de la polimerasa

(PCR), reacción en cadena de la ligasa (LCR) y por amplificación por desplazamiento de la hebra (SDA). Estas técnicas se pueden realizar empleando reactivos y protocolos disponibles comercialmente. Una técnica preferida es la PCR alelo-específica.

Descripción de las figuras

- 5 Indicaciones generales: En las figuras, 1) los términos TT, CC, GG o AA se entienden por ser T/T, C/C, G/G o A/A, y 2) el término CTA se entiende como C-T-A.

Figura 1: Organización del complejo génico IL1RN-IL1A-IL1B-IL1RN. Tanto rs315952 como rs9005 se localizan en el último exón de IL1RN. Aunque sólo hay 1107 bp (pares de bases) entre ellos, estos SNPs no se heredan juntos (es decir, no hay desequilibrio de ligamiento). IL1RN-rs9005 está dentro de la región 3' UTR y coincide con un factor de transcripción (ChIP-seq secuencia: FOSL2) y un núcleo ADNasa (regiones reguladoras y promotoras que tienden a ser sensibles a ADNasa). IL-1RN-rs315952 es un SNP de codificación silente (es decir, no conduce a un cambio del aminoácido).

Figura 2: Clasificación de los pacientes en función de la presencia o ausencia (a partir de al menos una copia) del haplotipo C-T-A. El eje Y muestra el cambio en la semana 52 en el volumen de cartílago total (unidad: mm³). Cada punto corresponde a un sujeto, el círculo indica un sujeto sin AIR mientras que la cruz indica un sujeto con AIRs. El valor p indicado se obtuvo a partir de un ensayo no paramétrico de variable única (test de suma de rangos).

Figura 3: Clasificación de los pacientes en función de la presencia o ausencia (a partir de al menos una copia) del haplotipo C-T-A. El eje Y muestra el cambio en la semana 52 en la puntuación total de WOMAC. Cada punto corresponde a un sujeto, el círculo indica un sujeto sin AIR mientras que la cruz indica un sujeto con AIRs. El valor p indicado se obtuvo a partir de un ensayo no paramétrico de variable única (test de suma de rangos).

Figura 4: Cambio en el volumen de cartílago total (mm³) en la semana 52 separados mediante regímenes de dosificación y por su genotipo en ambos rs315952 y rs9005. Cada punto corresponde a un sujeto, el círculo indica un sujeto sin AIR mientras que la cruz indica un sujeto con AIRs. Los datos MRI a partir del cohorte MAD010 muestran una variabilidad atípica y no se incluyeron en ningún análisis.

Figura 5: Cambio en la puntuación total de WOMAC en la semana 52 separados mediante regímenes de dosificación y por su genotipo en ambos rs315952 y rs9005. Cada punto corresponde a un sujeto, el círculo indica un sujeto sin AIR mientras que la cruz indica un sujeto con AIRs.

Figura 6: Clasificación de los pacientes en función de la presencia o ausencia del genotipo "G/G rs9005 y T/T rs315952". El eje Y muestra la puntuación total de WOMAC absoluta de referencia. Cada punto corresponde a un sujeto, el círculo indica un sujeto con un grado Kellgren-Lawrence igual a 2, mientras que la cruz indica un sujeto con un grado Kellgren-Lawrence igual a 3. El valor p indicado se obtuvo a partir de un ensayo no paramétrico de variable única (test de suma de rangos).

Figura 7: Clasificación de los pacientes en función de la presencia o ausencia del genotipo que 'tiene A rs9005 y tiene C rs315952'. El eje Y muestra la puntuación total de WOMAC absoluta de referencia. Cada punto corresponde a un sujeto, el círculo indica un sujeto con un grado Kellgren-Lawrence igual a 2, mientras que la cruz indica un sujeto con un grado Kellgren-Lawrence igual a 3. El valor p indicado se obtuvo a partir de un ensayo no paramétrico de variable única (test de suma de rangos).

Figura 8: Clasificación de los pacientes en función de la presencia o ausencia del genotipo 'G/G rs9005 y T/T rs315952'. El eje Y muestra el volumen de cartílago total absoluto (mm³) de referencia. Cada punto corresponde a un sujeto, el círculo indica un sujeto con un grado Kellgren-Lawrence igual a 2, mientras que la cruz indica un sujeto con un grado Kellgren-Lawrence igual a 3. El valor p indicado se obtuvo a partir de un ensayo no paramétrico de variable única (test de suma de rangos).

Figura 9: Clasificación de los pacientes en función de la presencia o ausencia del genotipo 'que tiene A rs9005 y teine C rs315952'. El eje Y muestra el volumen de cartílago total absoluto (mm³) de referencia. Cada punto corresponde a un sujeto, el círculo indica un sujeto con un grado Kellgren-Lawrence igual a 2, mientras que la cruz indica un sujeto con un grado Kellgren-Lawrence igual a 3. El valor p indicado se obtuvo a partir de un ensayo no paramétrico de variable única (test de suma de rangos).

Figura 10: Cambio a partir de la puntuación total de WOMAC de referencia para todos los sujetos independientemente de sus genotipos. Las líneas corresponden a un cambio medio de referencia y las barras de error corresponden al error estándar de la media.

Figura 11: Cambio a partir de la puntuación total de WOMAC de referencia de los sujetos identificados como sensibles o súper sensibles en base a sus genotipos en rs9005 y rs315952. El grupo 'tratado' corresponde a los sujetos a partir del cohorte MAD100 que tiene el genotipo que se identifica con los sujetos sensibles. También se incluyen en el grupo 'tratado' a los sujetos a partir del cohorte MAD030 que tiene el genotipo que se identifica con los sujetos súper sensibles. El grupo 'placebo' incluye a los sujetos placebo con genotipo que corresponde tanto a los

sensibles como a los súper sensibles. Las líneas corresponden al cambio medio a partir de la referencia y las barras de error corresponden al error estándar de la media.

5 Figura 12: Cambio a partir de la puntuación total de WOMAC de referencia de los sujetos que tienen el genotipo que corresponde a los no sensibles. Las líneas corresponden al cambio medio a partir de la referencia y las barras de error corresponden al error estándar de la media.

Figura 13: Cambio del volumen de cartílago total (mm^3) de referencia para todos los sujetos independientemente de sus genotipos. Las líneas corresponden a un cambio medio de referencia y las barras de error corresponden al error estándar de la media. Los datos MRI a partir del cohorte MAD010 mostraron una variabilidad atípica y no se incluyeron en ningún análisis.

10 Figura 14: Cambio del volumen de cartílago total (mm^3) de referencia para los sujetos identificados como sensibles o súper sensibles en base a sus genotipos en rs9005 y rs315952. El grupo 'tratado' corresponde a los sujetos a partir del cohorte MAD100 que tiene el genotipo que se identifica con los sujetos sensibles. También se incluyen en el grupo 'tratado' a los sujetos a partir del cohorte MAD030 que tiene el genotipo que se identifica con los sujetos súper sensibles. El grupo 'placebo' incluye a los sujetos placebo con genotipo que corresponde los sensibles o a los súper sensibles. Las líneas corresponden al cambio medio a partir de la referencia y las barras de error corresponden al error estándar de la media. Los datos MRI a partir del cohorte MAD010 no pasaron el control de calidad y no se incluyeron en ningún análisis.

20 Figura 15: Cambio del volumen de cartílago total (mm^3) de referencia para los sujetos que tienen el genotipo que corresponde a los no sensibles. Las líneas corresponden al cambio medio a partir de la referencia y las barras de error corresponden al error estándar de la media. Los datos MRI a partir del cohorte MAD010 mostraron una variabilidad atípica y no se incluyeron en ningún análisis.

Figuras 16(a)-(h): Conjunto de secuencias de ácidos nucleicos y de la longitud total de aminoácidos correspondientes a "SEQ ID NOs" en referencia a la solicitud de la presente memoria.

Descripción de las secuencias:

- 25 SEQ ID NO:1: Secuencia de aminoácidos del FGF-18 humano nativo.
 SEQ ID NO:2: Secuencia de aminoácidos del FGF-18 truncado recombinante (trFGF-18).
 SEQ ID NO:3: gen IL1RN
 SEQ ID NO:4: locus de IL1RN rs9005
 SEQ ID NO:5: locus de IL1RN rs315952
- 30 SEQ ID NO:6: Región específica del locus de IL1RN rs9005 (correspondiente al nucleótido 415 al nucleótido 466 de SEQ ID NO:4), en donde N es A o G
 SEQ ID NO:7: Región específica del locus de IL1RN rs315952 (correspondiente al nucleótido 415 al nucleótido 466 de SEQ ID NO:5), en donde N es C o T
 SEQ ID NO:8: cebador 1 de rs315952
- 35 SEQ ID NO:9: cebador 2 de rs315952
 SEQ ID NO:10: cebador 1 de rs9005
 SEQ ID NO:11: cebador 2 de rs9005

Ejemplos

1. Antecedentes de genotipado:

40 El nivel de crecimiento del volumen del cartílago y los riesgos asociados con efectos adversos en respuesta al tratamiento con esprifermina en trastornos del cartílago, tales como la osteoartritis, lesión del cartílago, fracturas que afectan al cartílago de la articulación o procedimientos quirúrgicos con impacto en el cartílago de la articulación (por ejemplo, microfractura) pueden estar asociados con una variación genética específica en uno o varios genes. En el presente estudio, se enfocó la búsqueda de asociaciones entre los genes que contienen variaciones y la enfermedad

45 o la respuesta al tratamiento en genes candidatos que se seleccionaron en base al papel fisiológico de las proteínas en la codificación e implicación potencial en los trastornos del cartílago, o en la respuesta al tratamiento con esprifermina. La lista de los SNPs candidatos seleccionados que se ensayaron se proporcionan en la Tabla 1.

La respuesta al tratamiento con esprifermina se midió mediante el cambio en el volumen del cartílago a partir de 1 año de referencia del comienzo del tratamiento con esprifermina.

Cabe señalar que los marcadores SNP candidatos y de exploraciones de todo el genoma no se conservaron para otros análisis si no se cumplía alguno de los siguientes criterios:

- SNP de variante rara en la PGx ITT de la población: Frecuencia alélica baja (MAF) < 10% para ambos SNP candidatos y exploraciones SNPs de todo el genoma.
- 5 • Calidad de genotipado cuestionable, como medida de una alta tasa ($\geq 5\%$) de pérdida de datos.
- Desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg (valor p ajustado según Bonferroni) menor del 5% para SNPs o FDR candidatos (es decir, valor p ajustado según Benjamini-Hochberg) inferior al 20% de los SNPs de las exploraciones de todo el genoma.
- 10 • Se excluyeron los sujetos con discrepancia de sexo entre la base de datos clínica y el sexo predictivo a partir de los datos de SNP de todo el genoma (cromosoma X).

Los genes candidatos seleccionados han sido implicados previamente en el trastorno del cartílago, tal como en la osteoartritis. El propósito del estudio era investigar si el nivel de respuesta, es decir, si el crecimiento del volumen del cartílago y/o la aparición de efectos adversos en respuesta al tratamiento con esprifermina en el trastorno del cartílago, se correlacionaba con una variante o un patrón de variantes de ADN específico. La existencia de tal correlación indicaría que el gen o genes que tiene la variante o variantes, o un gen o más genes situados en los alrededores de las variantes pueden ser genes susceptibles.

2. Materiales y métodos

2.1 Compuesto de FGF-18

El compuesto de FGF-18 que se usa como tratamiento en los presentes ejemplos, es esprifermina. Es una forma truncada de FGF-18, como se define en la sección “definiciones”.

2.2. Recepción de la muestra y codificación doble

Las muestras de sangre se recibieron de los pacientes participantes en el estudio 28980 (estudio aleatorio, doble ciego, controlado con placebo, multicéntrico, estudio de dosificación única y ascendente múltiple de esprifermina, administrada por vía intra-articular en pacientes con osteoartritis primaria de rodilla que no se preveían necesitar cirugía de rodilla dentro de un año).

Para cumplir con la autorización de consentimiento informado (ICF, de sus siglas en inglés) Farmacogenómico (PGx), que abarca los análisis de ADN, todas las muestras se codificaron por duplicado por el Biobanco (Merck Serono, Ginebra) para asegurar un nivel adicional de anonimato del sujeto. El Biobanco proporciona el Grupo de Control de Datos del Biomarcador con la codificación clave doblada como un archivo plano que contiene tanto la identificación (ID) PGx como la ID del sujeto de cada sujeto. Se realizaron verificaciones adicionales para asegurar que no realizaron análisis de ADN en sujetos que no dieron consentimiento para el estudio PGx.

2.3 Extracción de muestras de ADN, amplificación y marcaje

A partir de la sangre extraída se realizaron los análisis de ADN. Se recibió un total de 140 muestras de sangre. De estas 140, el laboratorio genómico destruyó 3 muestras de los pacientes que retiraron su consentimiento durante el transcurso del estudio; dando como resultado 137 ADNs analizados correspondientes a 137 pacientes. Por tanto, se realizó el genotipado de 137 pacientes aptos para los estudios de asociación.

A partir de las muestras de sangre se extrajo con EDTA el ADN genómico utilizando un kit de extracción Qiagen (QIAamp DNA Blood Maxi Kit). Después de la extracción, se realizaron las mediciones de absorbancia de las muestras a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm utilizando un espectrofotómetro y electroforesis en geles de agarosa, para estimar la cantidad y calidad de las muestras de ADN genómico.

Para cada placa, se digirieron las muestras de ADN genómico con endonucleasas de restricción NspI y StylI, junto con adaptadores específicos (Nsp o Sty), procesadas en paralelo hasta las Reacciones en Cadena de Polimerasa (PCR). Para producir un gran rendimiento, se amplificó por PCR el producto de ligación, por triplicado para reacciones de StylI, y por cuadruplicado para reacciones de NspI. Se agruparon, purificaron, cuantificaron, fragmentaron y marcaron todos los productos de PCR.

La etapa de amplificación de la PCR se evaluó utilizando electroforesis en gel de agarosa. La etapa de cuantificación de ADN se evaluó utilizando un espectrofotómetro y la etapa de fragmentación del ADN se evaluó utilizando electroforesis en gel de agarosa. El tamaño medio del fragmento de ADN deberá ser menor de 180 bp.

2.4. Tecnología de microarrays de ADN (Exploración de todo el genoma)

Se utilizaron los ensayos de Affymetrix Genome Wide SNP 6.0 para realizar la exploración de todo el genoma (hipótesis de enfoque libre). La tecnología Affymetrix se basa en un chip de ADN que permite el genotipado de

aproximadamente 906.600 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) por paciente. Los SNPs se distribuyen aleatoriamente en todos los cromosomas y se usan como marcadores de señalización de la correspondiente área genómica. Los detalles del proceso y el protocolo siguió la tecnología PGX Affymetrix del genoma completo SNP 5.0/6.0.

- 5 Para cada muestra, el producto marcado se hibridó en el chip genético de Affymetrix Genome Wide SNP 6.0. Se emplearon dos lotes de chips para ambos grupos.

Después de la hibridación y del marcaje, los chips genéticos Affymetrix se analizaron para crear archivos de datos de imagen (DAT). Después de esto, el programa informático AGCC alineó automáticamente una red eléctrica sobre los archivos DAT y registró el archivo de datos de intensidad celular (CEL). Posteriormente, los datos CEL pasaron a un programa informático Genotyping Console que genera datos de Análisis Sonda (CHP).

10 El control de la calidad de análisis (QC) se realizó utilizando el programa informático Genotyping Console que ensaya el análisis de Modelo Dinámico QC (DM) de referencia de un subconjunto de 3022 SNPs tras el escaneado del chip. El análisis DM de referencia mide la consistencia de las intensidades dentro de cada SNP, con cuatro estados de genotipado posible (Null, AA, AB y BB). Proporciona una estimación de la calidad general para una muestra de datos antes de realizar el análisis de agrupación completa. Se basa en el QC de referencia.

15 La QC de referencia (QC CR) está bien correlacionada con la realización del grupo y es eficaz en la métrica de una sola muestra para decidir qué muestras se deberán usar en la agrupación de las fases siguientes. El límite fijo para los chips del genoma completo SNP6.0 es $\geq 86\%$. Además del QC CR, se desarrolló otro algoritmo para los chips de SNP 6.0. Este nuevo algoritmo es el Contraste QC. El Contraste QC es una medida que captura la capacidad de un experimento para resolver las señales de SNP dentro de los grupos de tres genotipos. Mide la separación de las intensidades alélicas en tres grupos en el "espacio de contraste". El espacio de contraste es una proyección del espacio de intensidad alélica bidimensional en una única dimensión informativa. El límite por defecto es $\geq 0,4$ para cada muestra. Los resultados de QC se registran automáticamente en la Tabla de Intensidad QC. Las muestras que pasan el límite QC, (referencia $> 86\%$ y contraste QC $> 0,4$) se indican como "bound in", y aquellas que no pasan el límite QC (referencia $< 86\%$ y contraste QC $< 0,4$) se indican como "bound out". Todas las muestras de ADN genómico de estudio pasaron el control de calidad.

2.5 Genotipado de SNP TaqMan (gen candidato)

Se realizó el Genotipado SNP Taqman para seleccionar los marcadores seleccionados en base a la información de la bibliografía. Se seleccionó un total de 19 SNPs distribuidos en genes de 8 candidatos, y se llevó a cabo en dos periodos (véanse las Tablas 2a y 2b). En un ensayo de Genotipado SNP Taqman®, se emplean cebadores de PCR específicos de dos locus adyacentes al SNP para amplificar un fragmento de aproximadamente 100 bp. A continuación se hibridan sondas alelo-específicas a su secuencia SNP específica (véase, por ejemplo, la Tabla 3). Cada sonda se etiquetó en su extremo 5' bien con un tinte marcador fluorescente (FAM), o bien con un tinte marcador VIC. Cada sonda tiene también un tinte quencher no fluorescente, MGB, en su extremo 3'. En cada ciclo de PCR, si se amplifica la secuencia diana de la sonda alelo-específica, la sonda hibridará al ADN durante la etapa de re-asociación y expansión. Cuando la ADN polimerasa entra en contacto con esta sonda hibridada, el tinte marcador de la sonda se separa de la sonda dejando atrás el tinte quencher. En cada ciclo de PCR, la separación de los tintes marcadores de una o ambas sondas alelo-específicas causa un incremento potencial en la intensidad de fluorescencia. En la finalización del PCR, la fluorescencia total de cada muestra se lee en la ABI 9700 (formato de 384 pocillos). Si se observa fluorescencia sólo en una sonda, la muestra es homocigótica para este alelo. Si se observa fluorescencia para ambas sondas alelo-específicas, la muestra es heterocigótica para ambos alelos. Si la sonda no hibrida, la fluorescencia del tinte está "silenciada" o reducida por el tinte quencher, y por tanto, se observa una fluorescencia mínima, indicando un genotipo fallido.

El protocolo se detalla en la hoja de datos de TaqMan® SNP Genotyping.

- 45 Periodo 1: las muestras de ADN se genotiparon mediante 17 ensayos TaqMan® SNP (véase la Tabla 2a).

Periodo 2: las muestras de ADN se genotiparon mediante otros 2 ensayos TaqMan® SNP (véase la Tabla 2b).

Para cada uno de los ensayos TaqMan® SNP, el grupo NTC era específico y todos los NTCs eran indeterminados, estaban presentes los tres grupos de muestras distintas y el genotipado se asignó automáticamente y la referencia se especificó por estar por encima del 85 por ciento.

- 50 Para cada una de las tres partes de los 19 ensayos TaqMan® SNP, se alcanzaron los criterios de aceptación.

2.6. Filtrado de SNP

Los marcadores de los candidatos y de la exploración del genoma completo no se mantuvieron para el análisis si no se cumplía alguno de los siguientes criterios:

- SNP de variante rara en la PGx ITT de la población: Frecuencia alélica baja (MAF) $< 10\%$ para ambos SNP

candidatos y exploraciones SNPs de todo el genoma.

- Calidad de genotipado cuestionable, como medida de una alta tasa ($\geq 5\%$) de pérdida de datos.
- Desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg (valor p ajustado según Bonferroni) menor del 5% para SNPs o FDR candidatos (es decir, valor p ajustado según Benjamini-Hochberg) inferior al 20% de los SNPs de las exploraciones de todo el genoma.
- Se excluyeron los sujetos con discrepancia de sexo entre la base de datos clínica y el sexo predictivo a partir de los datos de SNP de todo el genoma (cromosoma X).

2.7. Ensayos de asociación

Para los ensayos de asociación, se codificaron los datos del genotipo como la presencia/ausencia del SNP del alelo secundario (es decir, homocigótico para el alelo principal en comparación con al menos una copia del alelo secundario).

2.7.1. Asociación con Reacciones Inflamatorias Agudas (AIRs)

En estos análisis, se emplearon sólo los sujetos tratados con una dosis de 100 mcg de FGF-18. Para el análisis de un solo marcador, se emplearon dos enfoques: el test exacto de Fisher, y un modelo lineal multivariable (es decir, estado de AIR ~ SNP + grado Kellgren Lawrence [2; 3] + Sexo [Femenino; Masculino] + Edad [<65; ≥ 65] + IMC [<30, ≥ 30]). En este modelo, la significancia de cada término en el modelo se ensayó con un anova tipo III).

2.7.2. Asociación con las puntuaciones totales de WOMAC y el volumen de cartílago total

Se ensayó la asociación del cambio entre la referencia y la semana 52 (fecha de finalización), tanto para las puntuaciones totales de WOMAC como para el volumen de cartílago total, empleando el siguiente modelo lineal:

Rango (cambio en el punto final) ~ Sección [Placebos, Sujetos tratados por ejemplo, con una dosis de 100 mcg de FGF-18] + grupo del genotipo + grado de Kellgren Lawrence [2; 3] + Sexo [Femenino; Masculino] + Edad [<65; ≥ 65] + IMC [<30, ≥ 30]. En este modelo, la significancia de cada término en el modelo se ensayó con un anova tipo III y el límite de significancia se estableció en $\alpha=5\%$.

2.7.3. Asociación entre un grupo de genotipo dado y el grado de Kellgren Lawrence

Para evaluar si un grupo con un genotipo dado (por ejemplo, sujetos con genotipo 'G/G en IL-1RN rs9005 y genotipo T/T en IL-1RN rs315952') tiene mucha o poca significancia en los sujetos con osteoartritis grave (es decir, grado 3 de Kellgren Lawrence) se realizaron ensayos empleando un test exacto de Fisher y la siguiente tabla de contingencia:

	Grado 3	Grado 2
# de sujetos de un grupo genotípico dado		
# de sujetos del resto de los grupos genotípicos		

Se incluyen en este análisis todos los sujetos disponibles a partir de cualquier régimen de dosificación (incluyendo los placebos). Se registraron los valores p empleando un ensayo bilateral y se estableció una significancia de $\alpha=5\%$. Se registraron también la razón de momios y sus intervalos de confianza 95%.

2.8. Análisis del haplotipo

Los datos de los genotipos de los SNPs rs419598, rs315952, rs9005 se organizaron (empleando el programa informático MACH, versión 1.0.18.c, Li Y et al., 2010) para deducir la presencia o ausencia del haplotipo C-T-A en los sujetos. Se utilizaron los siguientes parámetros MACH: "—50 rondas – 200 estados –fase". Se ensayó la asociación con AIRs utilizando el test exacto de Fisher (límite de significancia establecido en $\alpha=5\%$).

2.9. Análisis combinatorio entre SNPs candidatos

En análisis de asociación iniciales (datos no mostrados), se encontró el SNP rs9005 asociado significativamente con AIRs. Se realizaron análisis combinatorios (es decir, epistasia) para evaluar si IL-1RN rs9005 en combinación con otro SNP, de una lista de aproximadamente 120 SNPs candidatos, sería un mejor predictor de AIR (véase la Tabla 1). Tal análisis se realizó empleando el siguiente modelo de regresión logística:

estado AIR ~ otro SNP rs9005*+ grado Kellgren Lawrence [2; 3] + Sexo [Femenino; Masculino] + Edad [<65; ≥ 65] +

IMC [<30 , ≥ 30].

Se evaluó la significancia de cada término en el modelo con un anova tipo III. La interacción de los valores p se ajustó para un ensayo múltiple empleando el procedimiento de Benjamini-Hochberg (Benjamini y Hochberg, 1995, J. of the Royal Statistical Society Series B(57):289) y el límite de significancia se estableció en FDR=5%. Los efectos de epistasia se confirmaron mediante el enfoque estadístico descrito en (Wirapati et al., 2011).

2.10. Medición del rendimiento en la predicción de AIRs

La medición del rendimiento en la predicción de AIRs se derivaron a partir de la correspondiente tabla de contingencia. Estas mediciones incluían sensibilidad, especificidad, exactitud, precisión, valor predictivo negativo y puntuación F1 (es decir, medida armónica de la precisión y la referencia).

3. Resultados

3.1 Análisis predictivo

Los análisis combinatorios identificaron sólo una combinación (IL-1RN rs9005 y IL-1RN rs315952) asociada significativamente con AIRs (FDR a partir del modelo lineal multivariable = 0,0187, test exacto de Fisher valor p = 0,0018, razón de momios = 18,82 [2,25-260,03]). En la Tabla 5 y en la Tabla 6 se muestran la tabla de contingencia y la predicción de las medidas del rendimiento respectivamente. La combinación de rs9005 y rs315952 (Tabla 6) tiene una mejor rendimiento de la predicción de AIRs, comparado con el haplotipo C-T-A (Tabla 8 véase también la tabla de contingencia en la Tabla 7). La combinación de IL-1RN rs9005 y IL-1RN rs315952 tiene una especificidad muy fuerte (94,44%) y un valor predictivo negativo (89,47%), es decir, estos biomarcadores tienen buenos resultados en la identificación de los sujetos que no tendrán AIRs. Además, esta combinación revela separación en el volumen del cartilago total (Figura 4) y en las puntuaciones totales de WOMAC (figura 5). Por el contrario, el haplotipo C-T-A no permite tal separación de los resultados clínicos (Figuras 2 y 3). De hecho, el haplotipo C-T-A no permitió separar a los sujetos para el cambio en el volumen del cartilago total (Figura 2) ni para el cambio en la puntuación total de WOMAC (Figura 3). Por tanto, el haplotipo C-T-A no se identificó como un buen predictor de la respuesta a la terapia farmacológica, preferiblemente de un fármaco anabólico, tal como esprifermina.

3.2 Análisis pronósticos

Los sujetos placebo con el genotipo 'G/G IL-1RN rs9005 y T/T IL-1RN rs315952' se identificaron por tener un volumen de cartilago total significativamente mayor que el de los sujetos tratados del mismo grupo genotípico. Para investigar este resultado, se modelaron el cambio en la puntuación total de WOMAC y el cambio en el volumen de cartilago total en los sujeto placebo con la siguiente fórmula:

Rango (cambio en el punto final) ~ grupo del genotipo + grado de Kellgren Lawrence [2; 3] + Sexo [Femenino; Masculino] + Edad [<65 ; ≥ 65] + IMC [<30 , ≥ 30].

No se encontró una diferencia significativa en la puntuación total de WOMAC entre los sujetos de los cuatros grupos genotípicos diferentes (valor p = 0,63, Tabla 10). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en el cambio del volumen de cartilago total (valor p = 0,02, Tabla 9). Los sujetos del grupo del genotipo 'G/G IL-1RN rs9005 y T/T IL-1RN rs315952' tenían un volumen de cartilago total significativamente mayor comparado con el de los sujetos de los grupos genotípicos restantes.

La independencia del ensayo entre el grado de Kellgren-Lawrence y los sujetos a partir de un grupo genotípico dado demostró que el grupo del genotipo 'G/G IL-1RNrs9005 y el genotipo T/T IL-1RN rs315952' tiene una escasa significancia en los sujetos con un grado 3 de Kellgren-Lawrence (test exacto de Fisher valor p = 0,0179, Tabla 11). La razón de momios correspondiente es 0,306 (con intervalos de confianza del 95% [0,096, 0,885]). Esto demuestra que los sujetos del grupo genotípico 'G/G IL-1RN rs9005 y T/T IL-1RN rs315952' se clasifican con una enfermedad de osteoartritis menos grave que la de los sujetos de otros grupos genotípicos. Prestando soporte a este resultado, los sujetos del grupo genotípico 'G/G IL-1RN rs9005 y T/T IL-1RN rs315952' tienen puntuaciones totales de WOMAC mínimamente inferiores a la de los sujetos de referencia de otros grupos genotípicos (suma de rangos valor p = 0,0927, véase la Figura 6). Además, los sujetos del grupo del genotipo 'G/G IL-1RN rs9005 y T/T IL-1RN rs315952' tienen un volumen del cartilago total de referencia significativamente superior al de los sujetos de otros grupos genotípicos (suma de rangos valor p = 0,0204, véase la Figura 8).

Curiosamente, no hubo diferencia en el porcentaje de los sujetos con un grado 3 de Kellgren-Lawrence entre el grupo genotípico 'que tiene A en IL-1RN rs9005 y tiene C en IL-1RN rs315952' (es decir, súper sensibles) y los sujetos del resto de grupos genotípicos (test exacto de Fisher valor p = 0,2736, razón de momios = 1,693 [0,637, 4,769], Tabla 12). Por tanto, el grupo súper sensible no aumenta en los sujetos con una enfermedad de osteoartritis grave. Esto se confirma además con el hecho de que las puntuaciones totales de WOMAC de referencia y el volumen del cartilago total de referencia, son comparables entre los sujetos súper sensibles y otros sujetos (véanse las Figuras 7 y 9).

El análisis con el haplotipo C-T-A, no reveló diferencia en el porcentaje de sujetos con un grado 3 de Kellgren-

Lawrence y que soporta al menos una copia del haplotipo C-T-A (test exacto de Fisher valor $p = 1$).

3.3. Resultados clínicos utilizando el test diagnóstico genético

Sin ninguna clasificación genética, los resultados clínicos de la terapia con FGF-18 son los siguientes:

- 5 1) incremento significativo en el volumen de cartílago total (es decir, reparación del cartílago) en sujetos tratados (MAD100) en comparación con los sujetos placebo (valor $p = 0,0157$); 2) mejora muy pequeña en las puntuaciones totales de WOMAC en los sujetos tratados (MAD100) en comparación con los sujetos placebo (valor $p = 0,1044$); 3) 20% de AIRs en los sujetos tratados. Estos resultados se resumen en la Tabla 13 y los resultados detallados se presentan en la Tabla 14 y en la Tabla 15. Para la visualización de datos se proporcionan también las Figuras 10 y 13. Se entiende que las figuras 10 a 15 no corresponden al modelo lineal multivariable utilizado para los análisis.
10 Estas figuras se proporcionan sólo para facilitar la interpretación de los resultados.

El test diagnóstico propuesto (Tabla 4) tiene por objetivo:

1. Identificar a los sujetos sensibles y tratarlos con la dosis de FGF-18 propuesta (por ejemplo, 100 mcg).
2. Identificar a los sujetos súper sensibles y tratarlos con una dosis baja de FGF-18 (por ejemplo, 30 mcg).
3. Identificar a los sujetos no sensibles y excluirlos de la terapia con FGF-18.

15 Retrospectivamente, los resultados clínicos para los sujetos seleccionados para la terapia con FGF-18, son:

1. Incremento significativo en el volumen de cartílago total en los sujetos tratados (sensibles para cohorte MAD100 + súper sensibles para cohorte MAD030) en comparación con los placebo (valor $p = 0,0016$ Tabla 18, Figura 14). Los estudios de simulación (bootstrap) mostraron que esta mejora del volumen del cartílago es significativamente mayor que la mejora obtenida cuando no se utilizó el test diagnóstico (valor $p < 1E-4$).
- 20 2. Comparable mejora en las puntuaciones totales de WOMAC entre los sujetos tratados y los placebo (valor $p = 0,6603$, Tabla 17, Figura 11).d
3. 11,43% de AIRs en los sujetos tratados (Tabla 16).

Por el contrario, los sujetos identificados como no sensibles tienen los siguientes resultados clínicos:

- 25 1. Mejora significativamente más baja en el volumen de cartílago total en los sujetos tratados (no sensibles para cohorte MAD100) en comparación con los placebo (valor $p = 0,0289$, Tabla 21). Los sujetos con cohorte MAD030 tienen resultados similares a la de los sujetos del cohorte MAD100 (Figura 15). Por tanto, ninguna de las dosis investigadas mostró una mejora con respecto a la de los placebo.
- 30 2. Aunque el valor p del modelo lineal multivariable no es significativo (valor $p = 0,3068$, Tabla 20), no hay mejora en la puntuación total de WOMAC para los sujetos tratados (cambio medio = -1) mientras que es algo mejor para los placebo (cambio medio = -39). Los sujetos de los cohortes MAD010 y MAD030 tienen resultados similares a la de los sujetos del cohorte MAD100 (Figura 12). Por tanto, ninguna de las dosis investigadas mostró una mejora con respecto a la de los placebo.
3. 22,2% de AIRs en los sujetos tratados (Tabla 19).

Tablas

35 Tabla 1: Lista de SNPs candidatos

Gen/descripción	SNPs ensayados
FGF-18	rs3806929, rs4073716, rs9313543, rs4076077, rs4073717, rs6555956, rs10065728, rs4620037, rs11553493
FGFR1	s2288696, rs2978073, rs11777067, rs6983315, rs7012413, rs6996321
FGFR2	rs3135810, rs2278202, rs1649200, rs7090018, rs2912759, rs2912787, rs2981449, rs2981432, rs10736303, rs1078806, rs2981575, rs1219648, rs1219643, rs2912774, rs2162540, rs2981582, rs3135715, rs3750819, rs755793
FGFR3	rs17880763, rs17881656, rs17882190, rs17884368
FGFR4	rs442856, rs422421, rs2011077
FGFRL1	rs4647934

ES 2 660 818 T3

IL10	rs1878672, rs3024493, rs1554286, rs3024491, rs3024490
IL1A	rs1304037, rs3783550, rs3783525, rs1800587
IL1B	rs1143627, rs1143634, rs1143633, rs3136558
IL1RN	rs9005, rs315952, rs444413, rs3181052, rs419598, rs423904, rs442710, rs447713, rs451578, rs432014, rs431726, rs452204, rs3087266, rs579543
IL6	rs1800795, rs1800797, rs1474347, rs2069840, rs1800796
Asociación mínima con AIRs (a partir de exploración de todo el genoma)	rs5934659, rs12407610, rs1344049, rs10954969, rs1522844, rs2685592, rs6697273, rs887071, rs1105227, rs6846033, rs871746, rs11815080, rs6949763, rs897718, rs7651624, rs6989732, rs7786717, rs10093384, rs11737974, rs3122569, rs12453065, rs1992509, rs2202731, rs6897534, rs747159, rs4342357, rs2447011, rs4770271, rs10430746, rs7032155, rs10948190, rs7073333, rs6495812, rs946120, rs1047813, rs2032790, rs3865404, rs11040899, rs1968294, rs723077
Asociación mínima con la puntuación total de WOMAC (a partir de exploración de todo el genoma)	rs12410403, rs587505, rs9902708, rs734397, rs894013, rs932241
TNFRS1B	rs1061622
Región VDR	rs731236, rs7975232, rs1544410

Tabla 2a: Detalles de Id SNP TaqMan evaluados en el periodo 1

Símbolo Genético	Id rs	Id Ensayo	Alelos NCBI	Tipo de ensayo
FGF-18	rs4073716	C_27537611_10	C/T	Ensayado Funcionalmente
FGF-18	rs11553493	NA	G/T	Personalizado
FGF-18, NPM1	rs3806929	C_11274941_10	C/T	Ensayado Funcionalmente
FGFR2	rs755793	C_2414603_10	C/T	Validado
FGFR3	rs17881656	NA	C/T	Personalizado
FGFR3, LETM1	rs17880763	C_58182661_10	A/T	Ensayado Funcionalmente
FGFR3, LETM1	rs17882190	C_58182657_10	A/G	Ensayado Funcionalmente
IL1B	rs1143627	C_1839944_10	C/T	Validado
IL-6	rs1800795	hCV1839697	C/G	Personalizado/sistema SNPlex
IL6,LOC541472	rs1800796	C_11326893_10	C/G	Ensayado Funcionalmente
LETM1, FGFR3	rs17884368	C_58182646_10	A/G	Ensayado Funcionalmente
LOC100131885,FGFR2	rs3750819	C_27511529_10	C/G	Ensayado Funcionalmente
LOC541472,IL6	rs1800797	C_1839695_20	A/G	Ensayado Funcionalmente
TNFRSF1B	rs1061622	C_8861232_20	G/T	Ensayado Funcionalmente
VDR	rs7975232	C_28977635_10	A/C	Ensayado Funcionalmente
VDR	rs731236	C_2404008_10	C/T	Ensayado Funcionalmente
VDR	rs1544410	C_8716062_10	A/G	Validado
Símbolo Genético	Id rs	Id Ensayo	Alelos NCBI	Tipo de ensayo

ES 2 660 818 T3

IL1RN	rs9005	C_3133528_10	A/G	Ensayado funcionalmente
IL1RN	rs315952	C_11512470_10	C/T	Validado

Tabla 2b: Detalles de Id SNP TaqMan evaluados en el periodo 2

Símbolo del gen	Id de rs	Id de ensayo	Alelos NCBI	Tipo de ensayo
IL1RN	rs9005	C__3133528_10	A/G	Funcionalmente ensayado
IL1RN	rs315952	C__11512470_10	C/T	Validado

Tabla 3: Secuencias de cebadores Taqman

Referencia del SNP	ID del ensayo Applied Biosystems	Secuencias de los cebadores
rs315952	C_11512470_10	Cebador 1: GCTTCGCCTTCATCCGCTCAGACAG o secuencia complementaria Cebador 2:GGCCCCACCACCAGTTTTGAGTCTG o secuencia complementaria
rs9005	C_3133528_10	Cebador 1: TGTGCCTCTGCCTGTCTCCCCACC o secuencia complementaria Cebador 2: GGCTGGGAGCTCTGCAGAGCAGGAA o secuencia complementaria

Tabla 4: Categorías del genotipo identificado en la Dosis de cohorte Ascendente Múltiple (100 mcg)

		rs9005 (A/G)	
		G/G	Con A
rs315952 (T/C)	T/T	Grupo A: no sensibles (20% de MAD100)	Grupo B: Sensibles (27% de MAD100)
	Con C	Grupo C: Sensibles (38% de MAD100)	Grupo D: Súper sensibles (15% de MAD100)

Tabla 5: Tabla de contingencia: predicciones de AIRs en base a los genotipos rs9005 y rs315952 con sujetos de la sección MAD100 con FGF-18 (n=45)

		Estado AIR real	
		Sujetos con AIRs	Sujetos sin AIRs
Estado previsto	Previsto con AIRs	5	2
	Previsto sin AIRs	4	34

Tabla 6: Rendimiento en las predicciones de AIRs en base a los genotipos rs9005 y rs315952 con sujetos de la sección MAD100 con FGF-18 (n=45)

Medida del rendimiento	valor
Sensibilidad	55,56%
Exactitud	86,67%
Especificidad	94,44%
Precisión	71,43%
Valor predictivo negativo	89,47%
Sensibilidad y precisión (puntuación F1)	62,50%

Tabla 7: Tabla de contingencia: predicciones de AIRs en base de la presencia/ausencia del haplotipo C-T-A con sujetos de la sección MAD100 con FGF-18 (n=48)

		Estado AIR real	
		Sujetos con AIRs	Sujetos sin AIRs
Estado previsto	Previsto con AIRs	6	7
	Previsto sin AIRs	4	31

Tabla 8: Rendimiento en las predicciones de AIRs en base a la presencia/ausencia del haplotipo C-T-A con sujetos de la sección MAD100 con FGF-18 (n=48)

Medida del rendimiento	valor
Sensibilidad	60%
Exactitud	77,08%
Especificidad	81,58%
Precisión	46,15%
Valor predictivo negativo	88,57%
Sensibilidad y precisión (puntuación F1)	52,15%

Tabla 9: Modelo lineal multivariable para el cambio el en volumen de cartílago total sólo con sujetos placebo

término del modelo	coeficiente de regresión	Error Estándar	puntuación Z	Valor p
Intercepción	78,44	23,68	3,31	0,0035
Grupo [B-C-D; sólo A]	83,11	33,85	2,46	0,0234
Grado de Kellgren-Lawrence [2; 3]	-12,93	22,36	-0,58	0,5695
Edad [<65; >=65]	-15,83	20,86	-0,76	0,4569
IMC [<30; >=30]	4,02	21,61	0,19	0,8545

Sexo [Femenino; Masculino]	-15,01	20,31	-0,74	0,4683
-------------------------------	--------	-------	-------	--------

Tabla 10: Modelo lineal multivariable para la puntuación total de WOMAC sólo con sujetos placebo

término del modelo	coeficiente de regresión	Error Estándar	puntuación Z	Valor p
Intercepción	63,76	20,40	3,13	0,0051
Grupo [B-C-D; sólo A]	-13,98	28,71	-0,49	0,6313
Grado de Kellgren-Lawrence [2; 3]	-25,47	18,83	-1,35	0,1906
Edad [<65; >=65]	0,34	17,66	0,02	0,9847
IMC [<30; >=30]	46,97	18,08	2,60	0,0168
Sexo [Femenino; Masculino]	29,74	17,01	1,75	0,0950

Tabla 11: Tabla de contingencia: Grado de Kellgren-Lawrence (3 ó 2) en base a la presencia/ausencia del genotipo 'G/G rs9005 T/T rs315952' – El análisis se realizó utilizando todos los sujetos de todos los regímenes de dosificación (incluyendo los placebo). Test exacto de Fisher valor p es 0,0179, razón de momios es 0,306 con el 95% de intervalo de confianza [0,096, 0,885]

genotipo	Grado 3	Grado 2
G/G rs9005 T/T rs315952	7	15
otro	60	39

Tabla 12: Tabla de contingencia: Grado de Kellgren-Lawrence (3 ó 2) en base a la presencia/ausencia del genotipo 'A rs9005 C rs315952' – El análisis se realizó utilizando todos los sujetos de todos los regímenes de dosificación (incluyendo los placebo). Test exacto de Fisher valor p es 0,2736, razón de momios es 1,693 con el 95% de intervalo de confianza [0,637, 4,769]

genotipo	Grado 3	Grado 2
con A rs9005 con C rs315952	17	9
otro	50	45

Tabla 13: Resultados clínicos sin ensayo diagnóstico (45 sujetos tratados con 100 mcg de FGF-18 y 27 placebos) – Delta corresponde a la diferencia entre el cambio medio en los placebos y el cambio medio en los sujetos tratados. El valor p corresponde al valor p del modelo lineal multivariable ajustado para el sexo, edad, IMC y grado KL

Grupos A, B, C, D	Cambio medio en los sujetos placebo	Cambio medio en los sujetos tratados (MAD100)	delta	valor p
Cambio en la puntuación total de WOMAC	-19	-10	9	0,1044
Cambio en el volumen de cartílago total	-44,68	102,25	146,93	0,0157
%AIRs	3,7	20	16,3	NA

ES 2 660 818 T3

Tabla 14: Modelo lineal multivariable para el cambio en la puntuación total de WOMAC con todos los sujeto placebo y todos los sujetos tratados con MAD100

término del modelo	coeficiente de regresión	Error Estándar	Puntuación Z	Valor p (GLM)	LR Chi-cuadrado (anova)	Valor p (anova)
Intercepción	59,51	14,86	4,00	0,0002	NA	NA
Edad [<65; >=65]	11,07	12,61	0,88	0,3834	0,77	0,3802
Sección (dosis de 100 mcg)	19,51	12,02	1,62	0,1091	2,64	0,1044
IMC [<30; >=30]	13,24	12,09	1,10	0,2774	1,20	0,2734
Sexo [Femenino; Masculino]	20,13	11,84	1,70	0,0937	2,89	0,0890
Grado de Kellgren-Lawrence [2; 3]	0,14	11,79	0,01	0,9902	0,00	0,9902

Tabla 15: Modelo lineal multivariable para el cambio en el volumen de cartílago total con todos los sujeto placebo y todos los sujetos tratados con MAD100

término del modelo	coeficiente de regresión	Error Estándar	Puntuación Z	Valor p	LR Chi-cuadrado (anova)	Valor p (anova)
Intercepción	79,10	13,37	5,92	0,0000	NA	NA
Edad [<65; >=65]	-15,10	11,35	-1,33	0,1878	1,77	0,1832
Sección [Placebos; tratados]	26,12	10,81	2,42	0,0185	5,84	0,0157
IMC [<30; >=30]	-14,60	10,87	-1,34	0,1841	1,80	0,1795
Sexo [Femenino; Masculino]	1,05	10,65	0,10	0,9216	0,01	0,9213
Grado de Kellgren-Lawrence [2; 3]	-1,25	10,61	-0,12	0,9065	0,01	0,9061

Tabla 16: Resultados clínicos para sujetos clasificados como 1) sensibles (grupos B y C, n=29, tratados con 100 mcg de FGF-18) o 2) súper sensibles (grupo D, n=6, tratados con una dosis de FGF-18 inferior: 30 mcg). Se incluyeron en el análisis 24 placebos, con genotipos del grupo B, C o D – Delta corresponde a la diferencia entre el cambio medio en los placebos y el cambio medio en los sujetos tratados. El valor p corresponde al valor p del modelo lineal multivariable ajustado para el sexo, edad, IMC y grado KL

Grupos B, C, D	Cambio medio en los sujetos placebo	Cambio medio en los sujetos tratados (MAD100+MAD30)	delta	valor p
Cambio en la puntuación total de WOMAC	-16,5	-13	3,5	0,6603
Cambio en el volumen de cartilago total	-114,91	102,25	217,16	0,0016
%AIRs	0	11,43	11,43	NA

Tabla 17: Modelo lineal multivariable para el cambio en la puntuación total de WOMAC con sujetos clasificados como 1) sensibles (grupos B y C, n=29, tratados con 100 mcg de FGF-18) o 2) súper sensibles (grupo D, n=6, tratados con una dosis de FGF-18 inferior: 30 mcg). Se incluyeron en el análisis 24 placebos, con genotipos del grupo B, C o D

término del modelo	coeficiente de regresión	Error Estándar	Puntuación Z	Valor p (GLM)	LR Chi-cuadrado (anova)	Valor p (anova)
Intercepción	67,09	16,25	4,13	0,0001	NA	NA
Edad [<65; >=65]	7,23	13,33	0,54	0,5900	0,29	0,5877
Sección [Placebos; tratados]	5,82	13,24	0,44	0,6621	0,19	0,6603
IMC [<30; >=30]	3,87	12,82	0,30	0,7641	0,09	0,7629
Sexo [Femenino; Masculino]	16,54	13,68	1,21	0,2322	1,46	0,2268
Grado de Kellgren-Lawrence [2; 3]	6,67	13,09	0,51	0,6124	0,26	0,6103

Tabla 18: Modelo lineal multivariable para el cambio en el volumen de cartilago total con sujetos clasificados como 1) sensibles (grupos B y C, n=29, tratados con 100 mcg de FGF-18) o 2) súper sensibles (grupo D, n=6, tratados con una dosis de FGF-18 inferior: 30 mcg). Se incluyeron en el análisis 24 placebos, con genotipos del grupo B, C o D

término del modelo	coeficiente de regresión	Error Estándar	Puntuación Z	Valor p (GLM)	LR Chi-cuadrado (anova)	Valor p (anova)
Intercepción	64,94	14,46	4,49	0,0000	NA	NA
Edad [<65; >=65]	-15,89	11,86	-1,34	0,1860	1,79	0,1803
Sección [Placebos;	37,14	11,78	3,15	0,0027	9,94	0,0016

ES 2 660 818 T3

tratados]						
IMC [<30; >=30]	-5,47	11,40	-0,48	0,6332	0,23	0,6312
Sexo [Femenino; Masculino]	1,14	12,18	0,09	0,9258	0,01	0,9254
Grado de Kellgren-Lawrence [2; 3]	1,27	11,65	0,11	0,9137	0,01	0,9133

Tabla 19: Resultados clínicos para los sujetos clasificados como no sensibles mediante el test diagnóstico (MAD100 n=9, MADPL n=3) – Delta corresponde a la diferencia entre el cambio medio en los sujetos placebo y el cambio medio en los sujetos tratados. El valor p corresponde al valor p del modelo lineal multivariable ajustado para el sexo, edad, IMC y grado KL

Sólo Grupo A	Cambio medio en los sujetos placebo	Cambio medio en los sujetos tratados (MAD100)	delta	valor p
Cambio en la puntuación total de WOMAC	-39	-1	38	0,3068
Cambio en el volumen de cartílago total	224,56	117,92	-106,64	0,0289
%AIRs	33,33	22,22	-11,11	NA

Tabla 20: Modelo lineal multivariable para el cambio en la puntuación total de WOMAC con sujetos clasificados como no sensibles mediante el test diagnóstico (MAD100 n=9, MADPL n=3)

término del modelo	coeficiente de regresión	Error Estándar	Puntuación Z	Valor p (GLM)	LR Chi-cuadrado (anova)	Valor p (anova)
Intercepción	38,99	40,18	0,97	0,3693	NA	NA
Edad [<65; >=65]	1,62	45,92	0,04	0,9730	0,00	0,9718
Sección [Placebos; tratados]	43,10	42,18	1,02	0,3462	1,04	0,3068
IMC [<30; >=30]	18,24	38,93	0,47	0,6558	0,22	0,6393
Sexo [Femenino; Masculino]	43,01	33,47	1,29	0,2461	1,65	0,1987
Grado de Kellgren-Lawrence [2; 3]	-19,53	34,44	-0,57	0,5911	0,32	0,5706

Tabla 21: Modelo lineal multivariable para el cambio en el volumen de cartílago total con sujetos clasificados como no sensibles mediante el test diagnóstico (MAD100 n=9, MADPL n=3)

término del modelo	coeficiente de regresión	Error Estándar	Puntuación Z	Valor p (GLM)	LR Chi-cuadrado (anova)	Valor p (anova)
Intercepción	128,67	15,26	8,43	0,0002	NA	NA
Edad [<65; >=65]	47,00	17,44	2,70	0,0358	7,27	0,0070
Sección [Placebos; tratados]	-35,00	16,02	-2,19	0,0715	4,78	0,0289
IMC [<30; >=30]	30,67	14,78	2,07	0,0834	4,30	0,0380
Sexo [Femenino; Masculino]	-39,00	12,71	-3,07	0,0220	9,42	0,0022
Grado de Kellgren-Lawrence [2; 3]	7,00	13,08	0,54	0,6117	0,29	0,5925

Tabla 22: Resumen de los resultados clínicos y de las opciones terapéuticas potenciales en base a los genotipos rs9005 y rs315952

	Grupo A	Grupos B y C	Grupo D	
	100mcg	100mcg	100mcg	30mcg
Cambio en la puntuación total de WOMAC	Empeoramiento significativo de la puntuación WOMAC comparado con el placebo	Cambio en la puntuación WOMAC comparable a la del placebo	Cambio en la puntuación WOMAC mayor que en el placebo	Cambio en la puntuación WOMAC comparable a la del placebo
Cambio en el volumen de cartílago total	Sin mejora	Significativa mejora del volumen del cartílago	Significativa mejora del volumen del cartílago (mejora máxima entre todos los grupos tratados con 100mcg)	Significativa mejora del volumen del cartílago (significativamente mejor que con 100mcg)
AIRs	2/9 sujetos tratados (1/3 en placebos)	2/29 sujetos tratados (0/17 en placebos)	5/7 sujetos tratados (0/7 en placebos)	2/6 sujetos tratados (0/7 en placebos)
Opción terapéutica potencial	Sin beneficio de la terapia con FGF-18	Tratar hasta 100mcg	Tratar a 30mcg	

Referencias

- 1) WO2008/023063
- 2) WO2004/032849
- 3) WO2006/063362
- 4) WO2009/135218

- 5) WO 92/15712
- 6) US 5.679.524
- 7) WO 91/02087
- 8) WO 90/09455
- 5 9) WO 95/17676
- 10) US 5.302.509
- 11) US 5.945.283
- 12) US 5.605.798
- 13) WO 89/10414
- 10 14) http://www.cartilage.org/_files/contentmanagement/ICRS_evaluation.pdf
- 15) Lotz, 2010, Arthritis research therapy, 12:211
- 16) Ellsworth et al., 2002, Osteoarthritis and Cartilage, 10: 308-320
- 17) Shimoaka et al., 2002, J. Bio. Chem. 277(9):7493-7500
- 18) The Merck Manual, 17ª edición, página 449
- 15 19) Bellamy et al., 1988, J.Rheumatology, 15:1833-1840
- 20) Wolfe, 1999, Rheumatology, 38:355-361
- 21) Attur et al., Ann. Rheum. Dis. 2010, 69:856-861
- 22) Li et al., 2010, Genet Epidemiol 34:816-834
- 23) Benjamini y Hochberg, 1995, J. of the Royal Statistical Society Series B(57):289
- 20 24) Wirapati et al., 2011, Ann. Hum. Genet. 75(1):133-45
- 25) Bateson W. y Mendel G., 1909, "Mendel's principles of hereditary". Prensa de la Universidad de Cambridge; 1909. Disponible: <http://archive.org/details/mendelsprinciple00bate>
- 26) Phillips PC., 1998, Genetics. 7;149(3):1167-71.
- 27) Cordell HJ., 2002, Hum. Mol. Genet. 11(20):2463-8.
- 25 28) Fisher RA, 1918, "The Correlation Between Relatives on the Supposition of Mendelian Inheritance". Disponible: <http://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/handle/2440/15097>.
- 29) Browning SR y Browning BL, 2011, Nature Reviews Genetics. 12(10):703-14.

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir la sensibilidad al tratamiento con un compuesto de FGF-18 en un sujeto que tiene un trastorno del cartílago, comprendiendo el método las etapas de:
 - 5 a. Determinar, a partir de una muestra de ácido nucleico, el genotipo de ambos locus de IL-1RN rs9005 y de IL-1RN rs315952;
 - b. Predecir a partir del resultado de la etapa a, la sensibilidad alta, intermedia, baja o inexistente de dicho sujeto al tratamiento con FGF-18.
2. El método según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
 - 10 a. Determinar, a partir de la muestra de ácido nucleico, la presencia del genotipo G/G en IL-1RN rs9005 y T/T en IL-1RN rs315952, y
 - b. Predecir a partir de la presencia de dicho genotipo la sensibilidad baja o inexistente al tratamiento con un compuesto de FGF-18.
3. El método según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
 - 15 a. Determinar, a partir de la muestra de ácido nucleico, la presencia del genotipo A/G o A/A en IL-1RN rs9005 y T/C o C/C en IL-1RN rs315952, y
 - b. Predecir a partir de la presencia de dicho genotipo la sensibilidad alta al tratamiento con un compuesto de FGF-18.
4. El método según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
 - 20 a. Determinar, a partir de la muestra de ácido nucleico, la presencia de un genotipo que se selecciona del grupo que consiste en:
 - i. G/G en IL-1RN rs9005 y T/C o C/C en IL-1RN rs315952, o
 - ii. A/G o A/A en IL-1RN rs9005 y T/T en IL-1RN rs315952, y
 - 25 b. Predecir a partir de la presencia de dicho genotipo la sensibilidad intermedia al tratamiento con un compuesto de FGF-18.
5. Un método para seleccionar a un paciente que tiene un trastorno del cartílago para la inclusión o exclusión de un tratamiento o ensayo clínico, con un compuesto de FGF-18, en base a su probabilidad de ser sensible a dicho tratamiento, comprendiendo las etapas de:
 - 30 a. Determinar, a partir de la muestra de ácido nucleico, el genotipo de ambos locus IL-1RN rs9005 y IL-1RN rs315952, en donde el genotipo del paciente con respecto a dicho locus es predictivo acerca del riesgo de un paciente de ser sensible o no sensible a dicho tratamiento, y
 - b. Seleccionar los pacientes sensibles por ser adecuados para dicho tratamiento.
6. El método según la reivindicación 5, que comprende las etapas de:
 - 35 a. Determinar, a partir de la muestra de ácido nucleico, la presencia del genotipo G/G en IL-1RN rs9005 y T/T en IL-1RN rs315952, y
 - b. Excluir a los pacientes que presentan dicho genotipo del tratamiento con el compuesto de FGF-18.
7. El método según la reivindicación 5, que comprende las etapas de:
 - 40 a. Determinar, a partir de la muestra de ácido nucleico, la presencia de un genotipo que se selecciona del grupo que consiste en:
 - i. G/G en IL-1RN rs9005 y T/C o C/C en IL-1RN rs315952, o
 - ii. A/G o A/A en IL-1RN rs9005 y T/T, T/C o C/C en IL-1RN rs315952, y
 - b. Incluir al paciente que presenta cualquiera de dichos genotipos en el tratamiento con un compuesto de FGF-18.
8. El método según la reivindicación 7, en donde dicho paciente se seleccionará además para un régimen terapéutico alternativo, en el que la dosis del compuesto de FGF-18 del régimen terapéutico alternativo que se

administra se reduce en comparación con la dosis del compuesto de FGF-18 a administrar a un paciente que no presenta riesgo de ser muy sensible al tratamiento con el compuesto de FGF-18, dicho paciente deberá presentar el genotipo A/G o A/A en IL-1RN rs9005 y T/C o C/C en IL-1RN rs315952.

5 9. El método según la reivindicación 7, en donde dicho paciente se seleccionará además para un régimen terapéutico alternativo, en el que la dosis del compuesto de FGF-18 del régimen alternativo que se administra se reduce en comparación con la dosis del compuesto de FGF-18 a administrar a un paciente que no presenta riesgo de desarrollar efectos AIR, dicho paciente deberá presentar el genotipo A/G o A/A en IL-1RN rs9005 y T/C o C/C en IL-1RN rs315952.

10 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el trastorno del cartílago se selecciona del grupo que consiste en osteoartritis, lesión del cartílago, fracturas que afectan al cartílago de la articulación o procedimientos quirúrgicos con impacto sobre el cartílago de la articulación, tal como la microfactura.

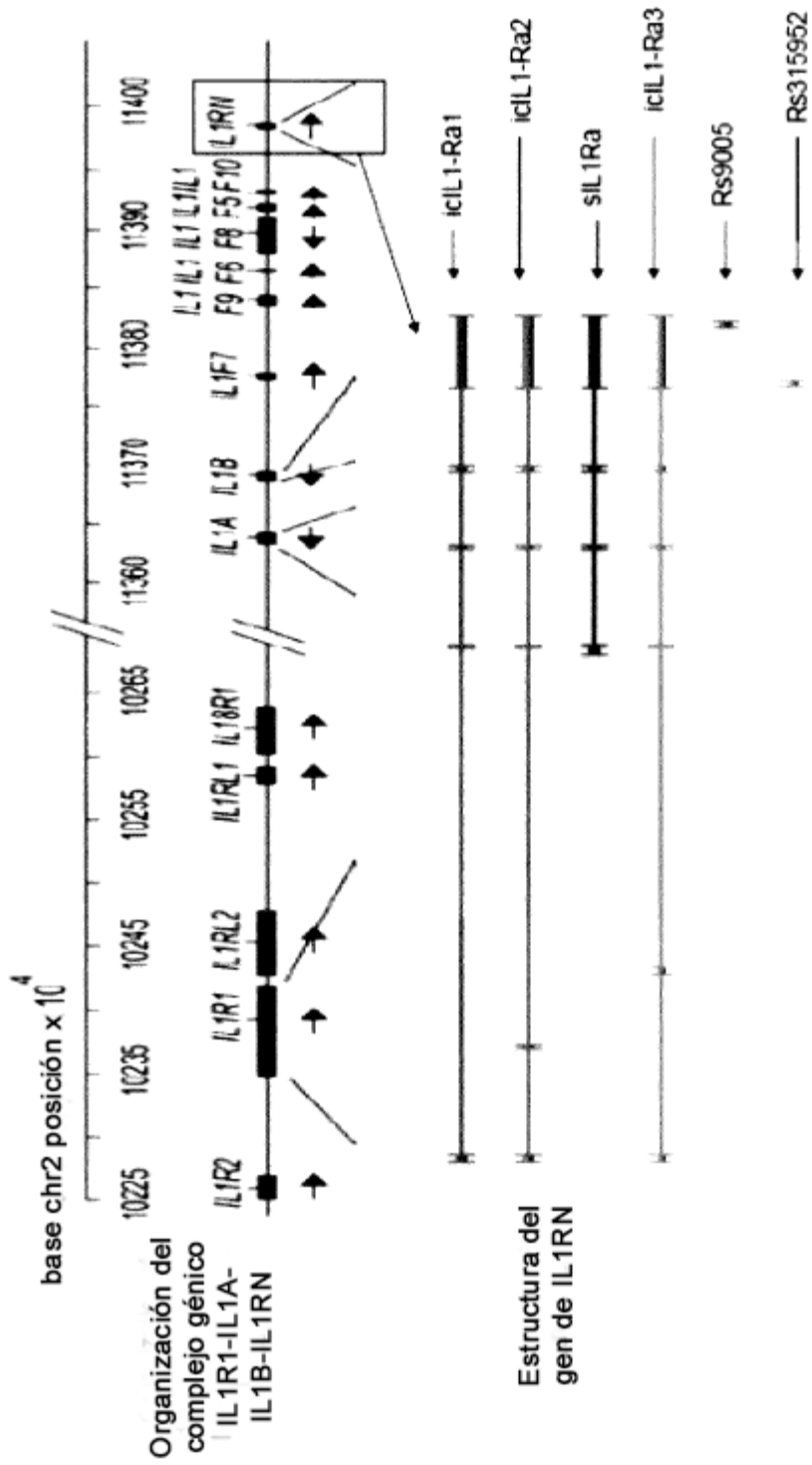


Fig. 1

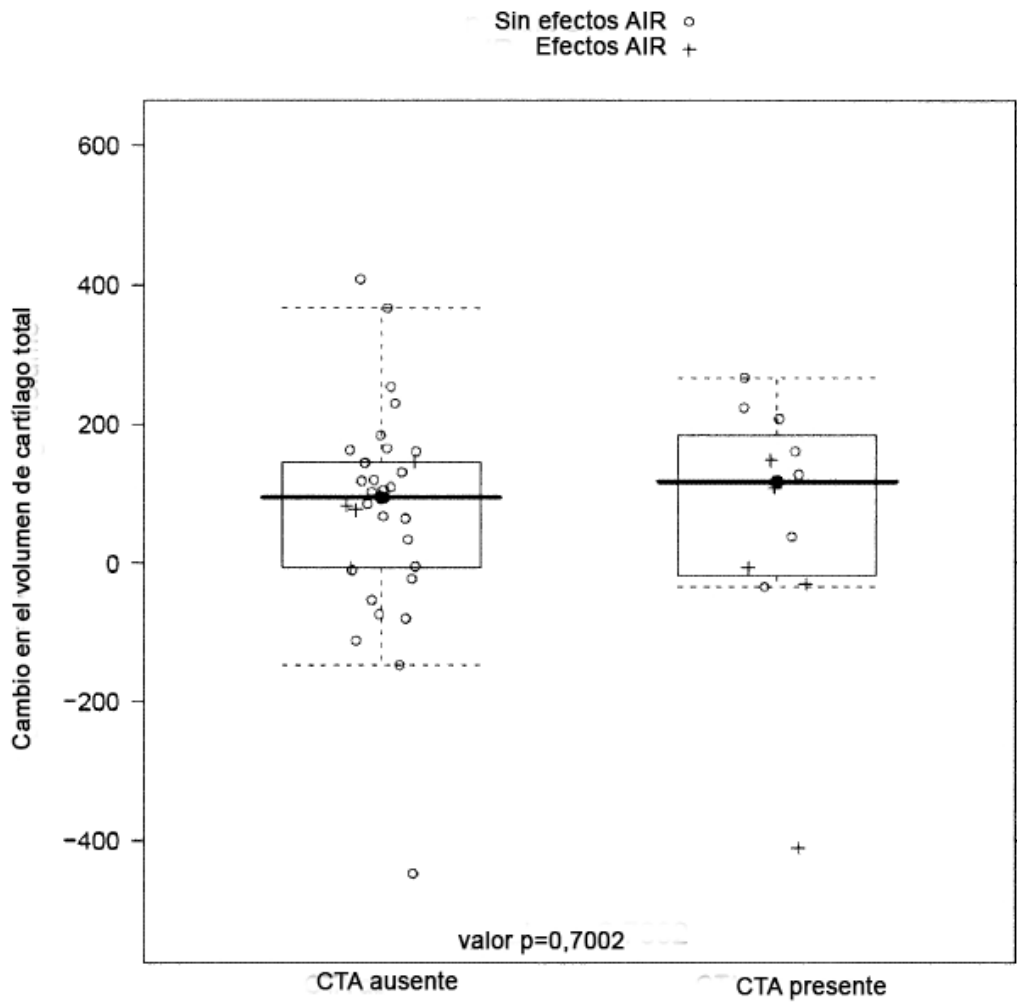


Fig. 2

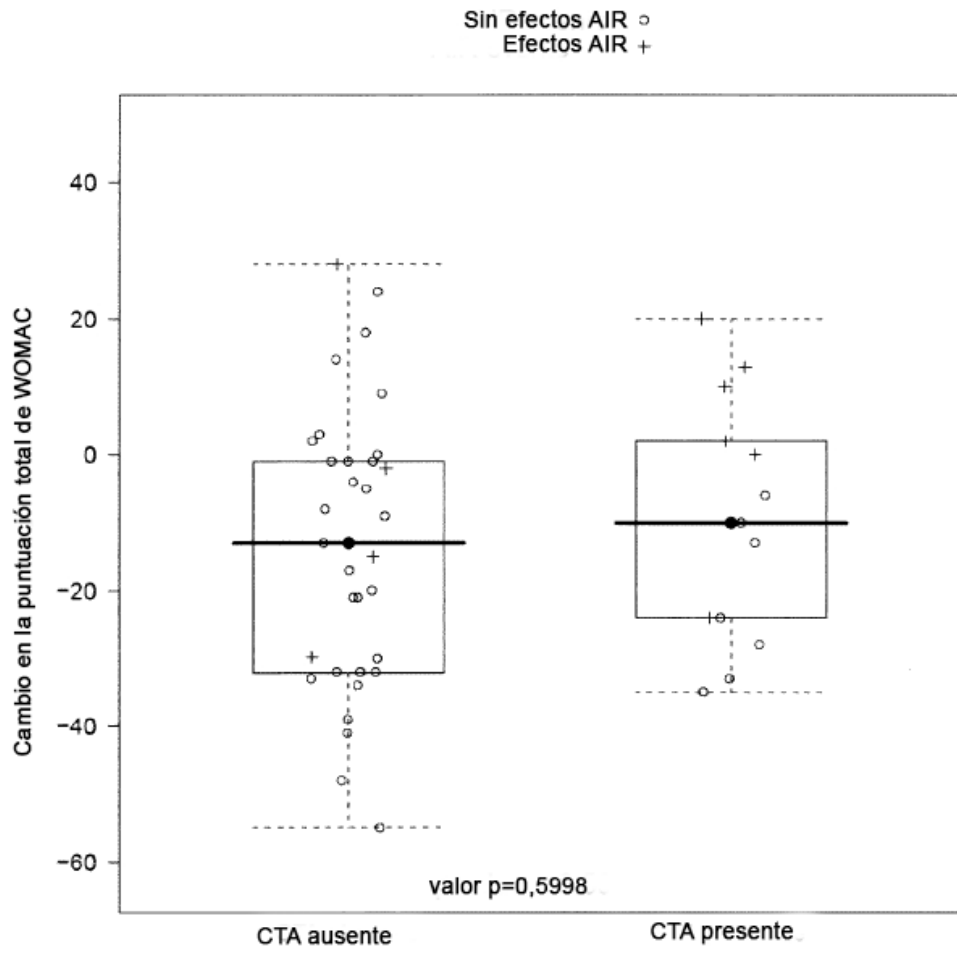


Fig. 3

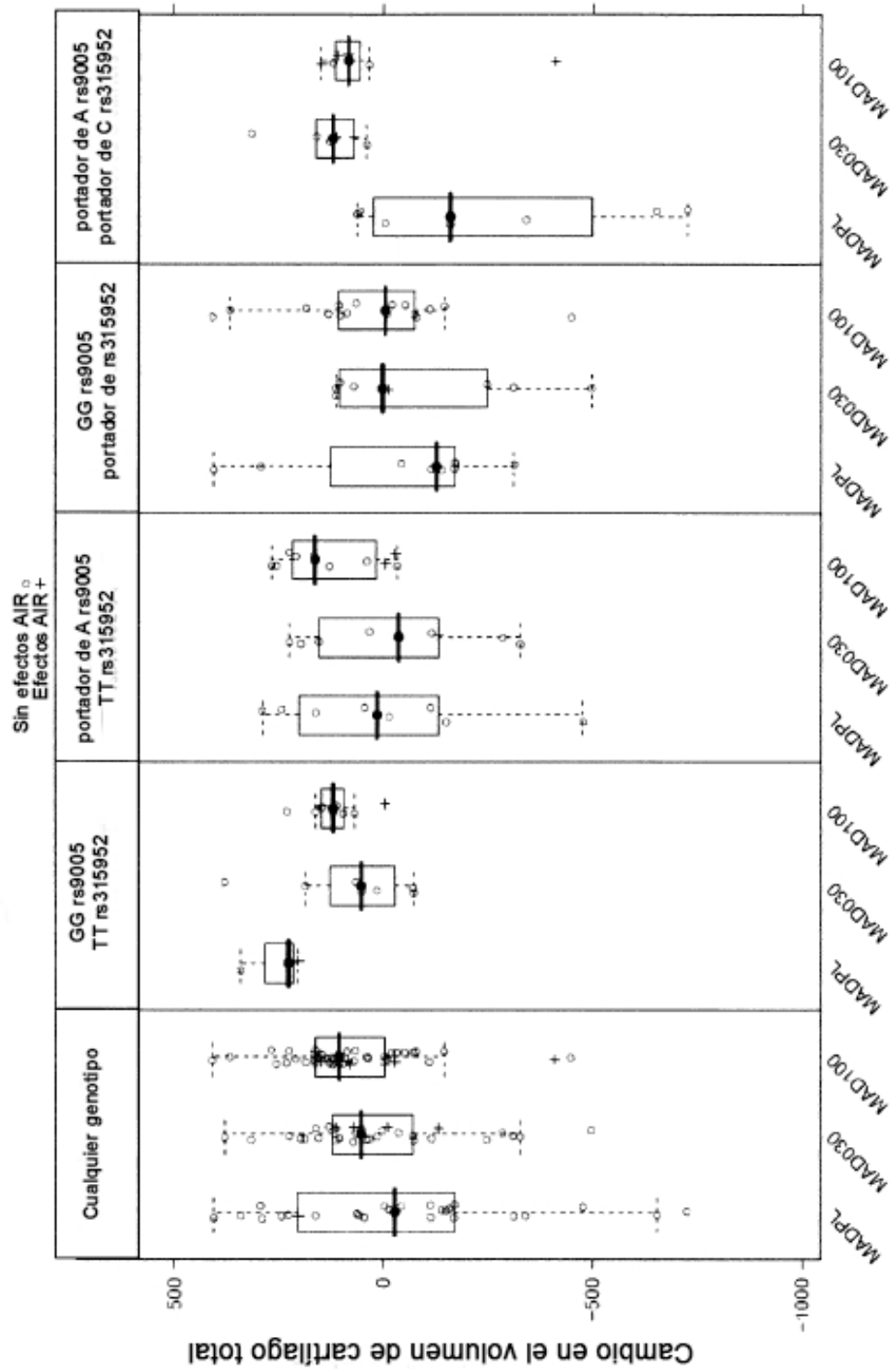


Fig. 4

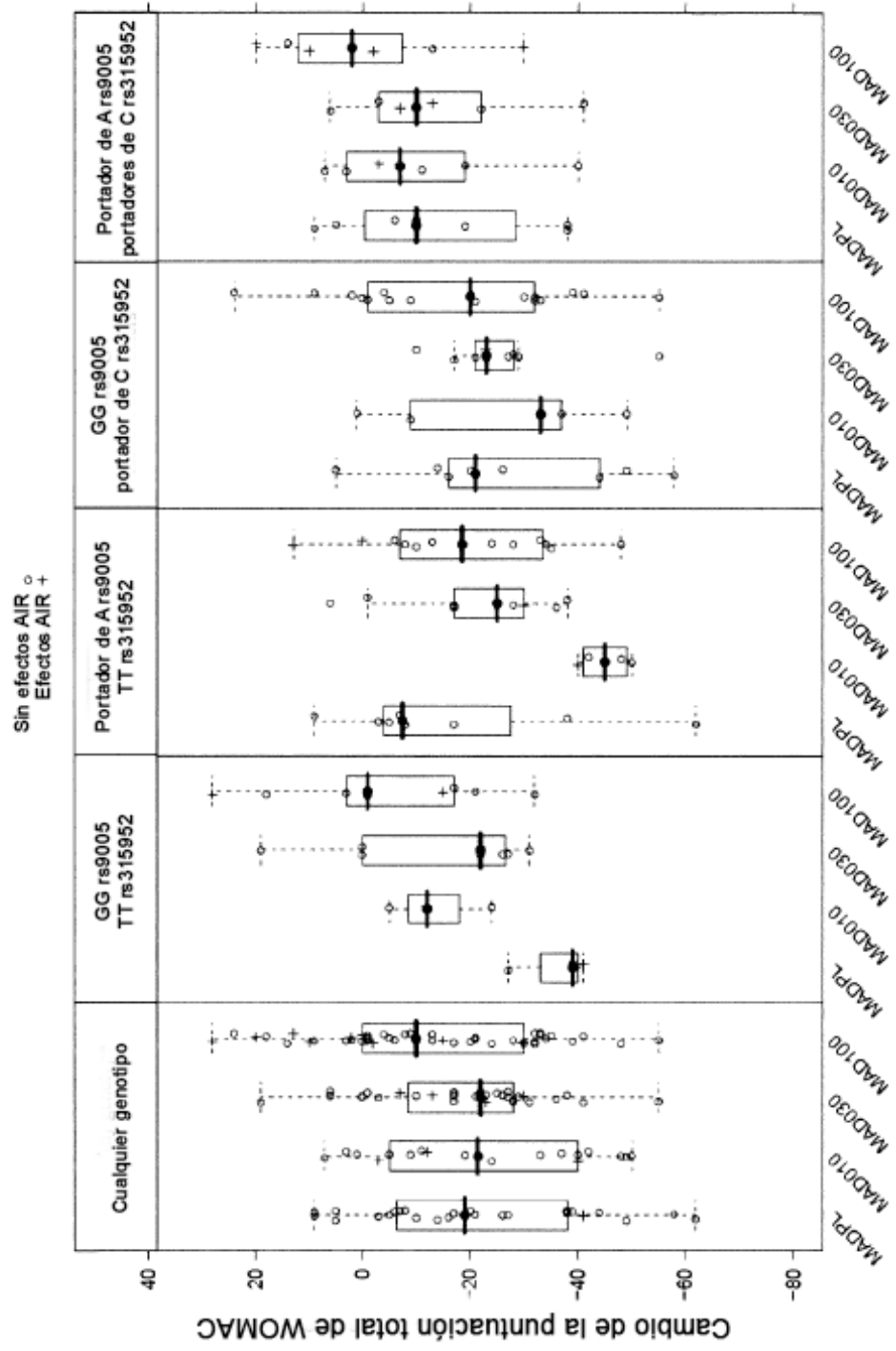


Fig. 5

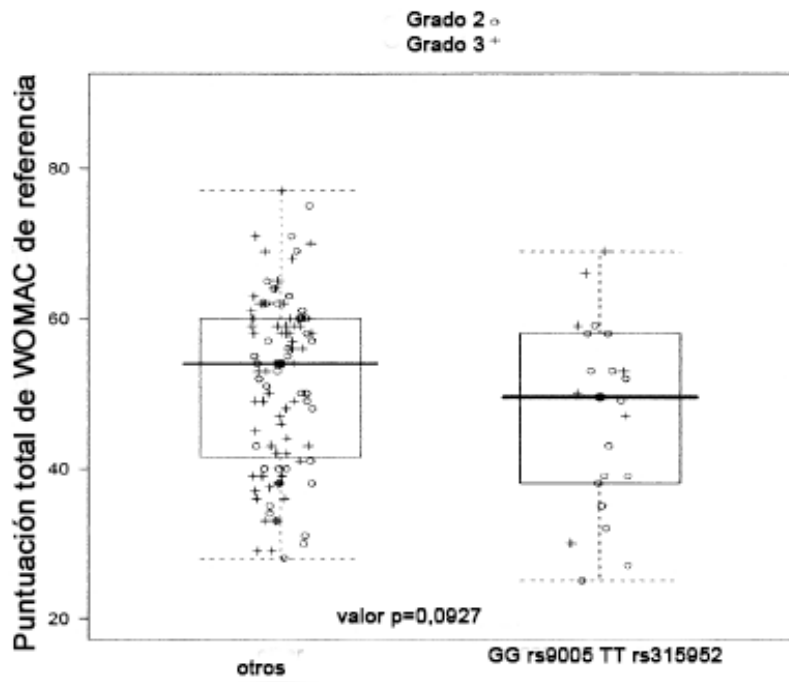


Fig. 6

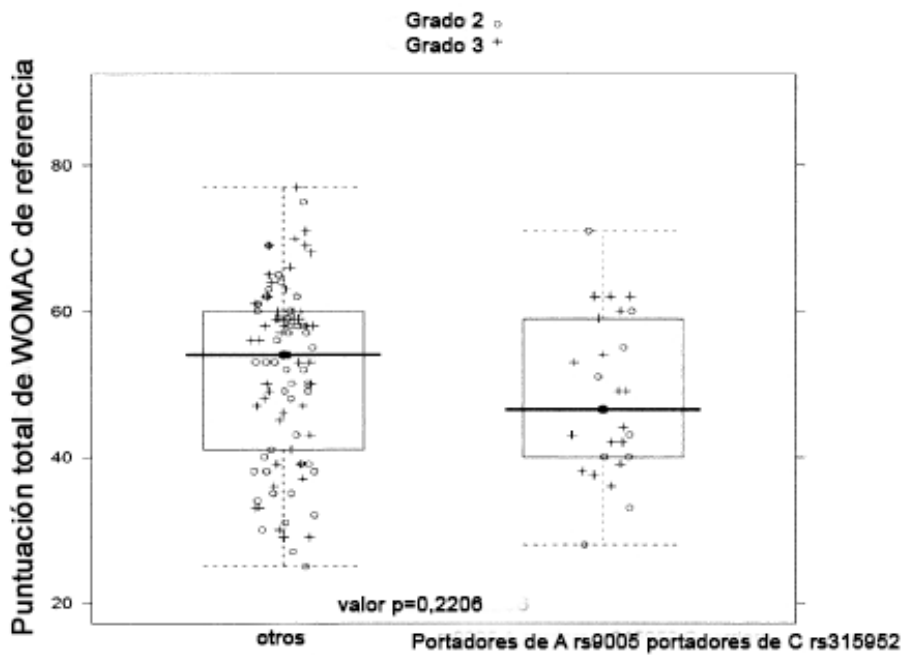


Fig. 7

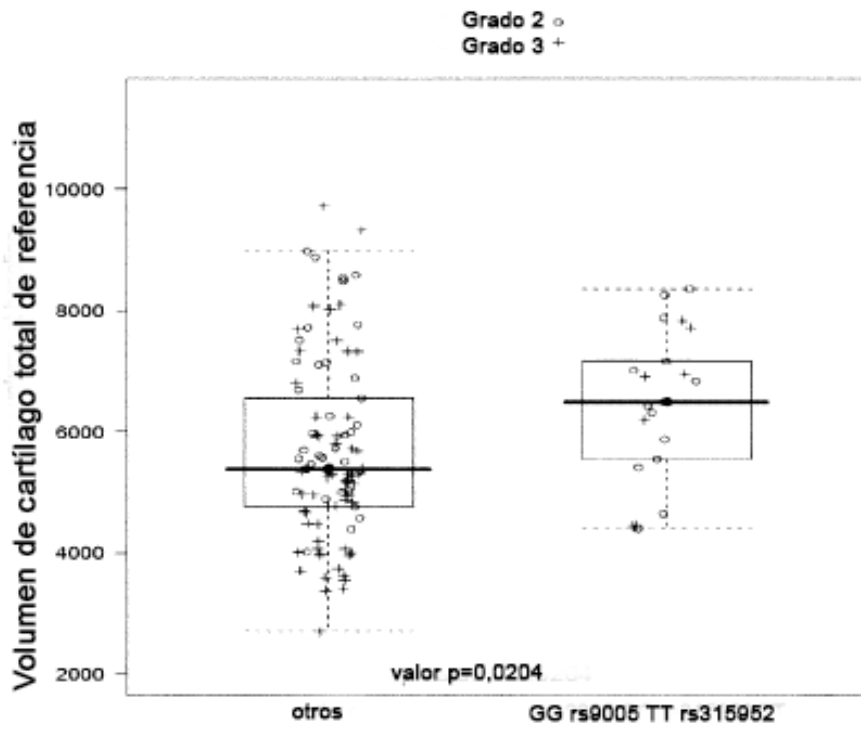


Fig. 8

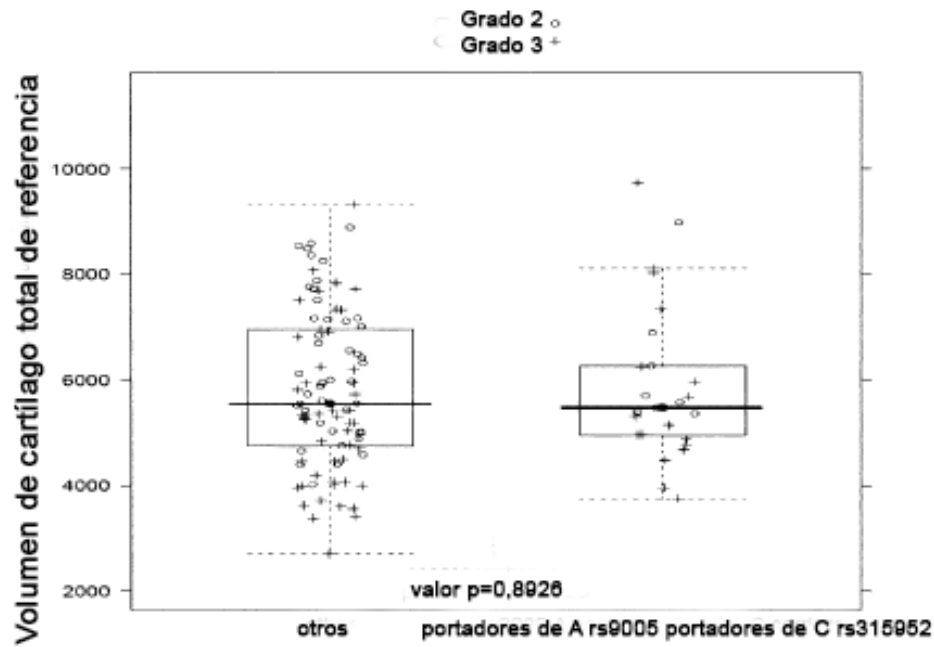


Fig. 9

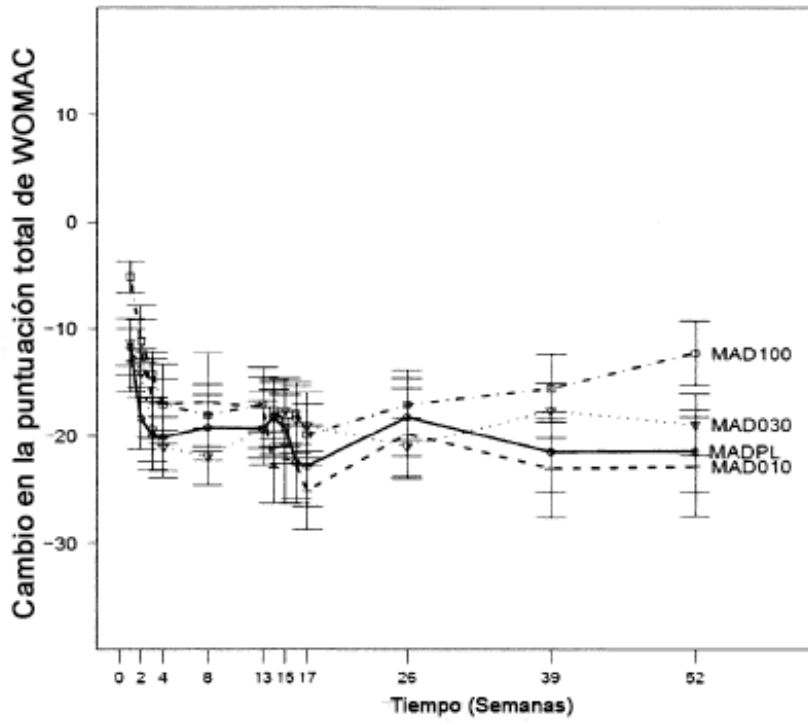


Fig. 10

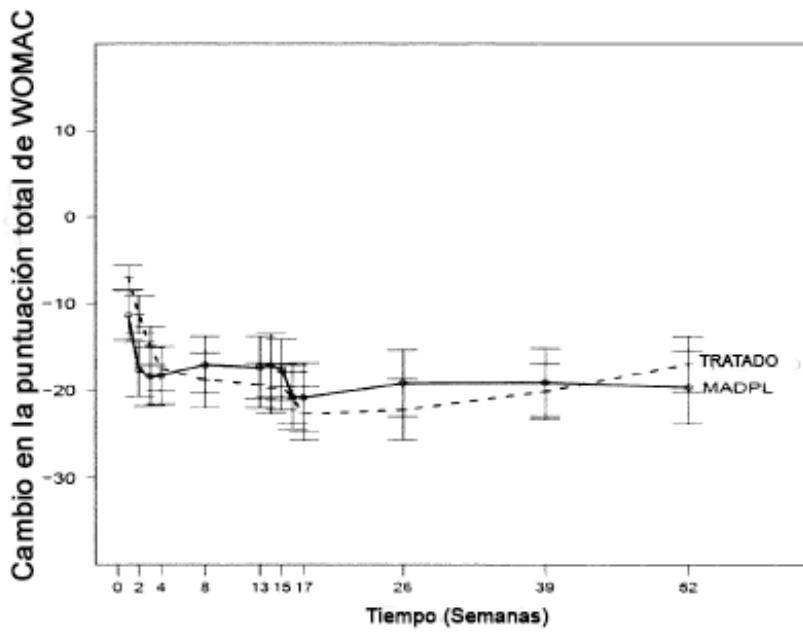


Fig. 11

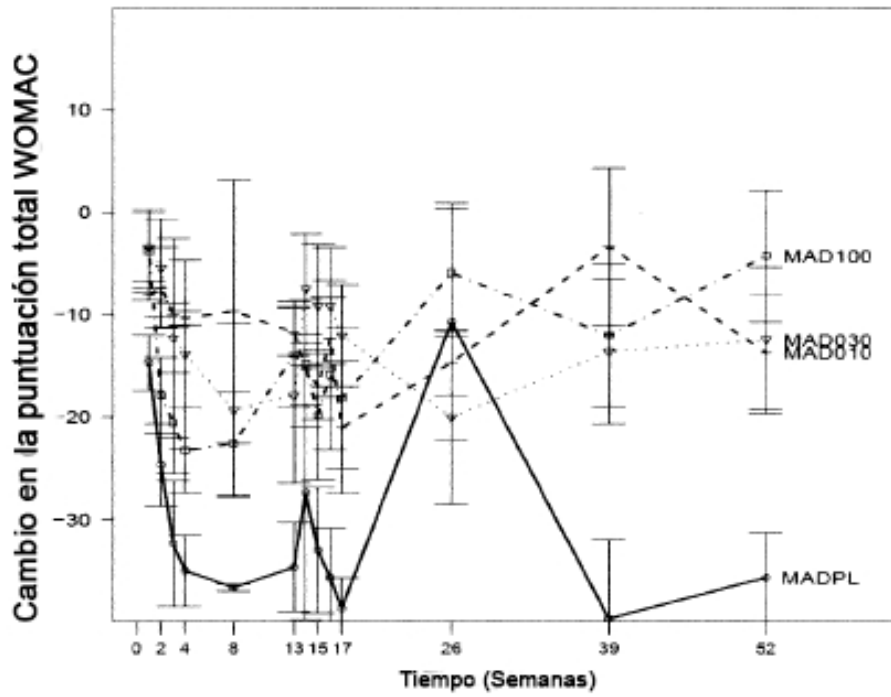


Fig. 12

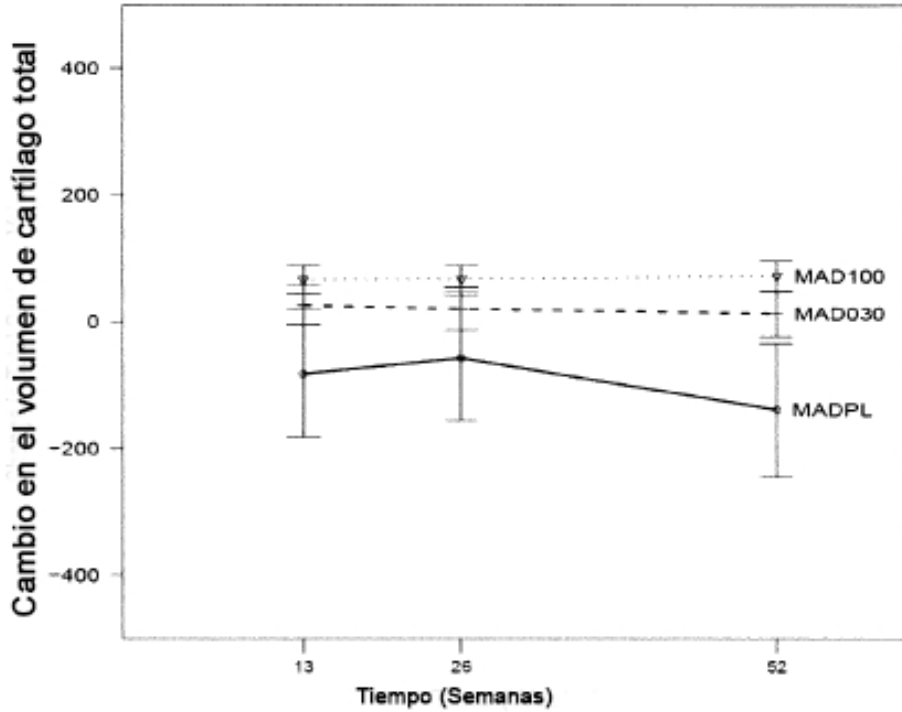


Fig. 13

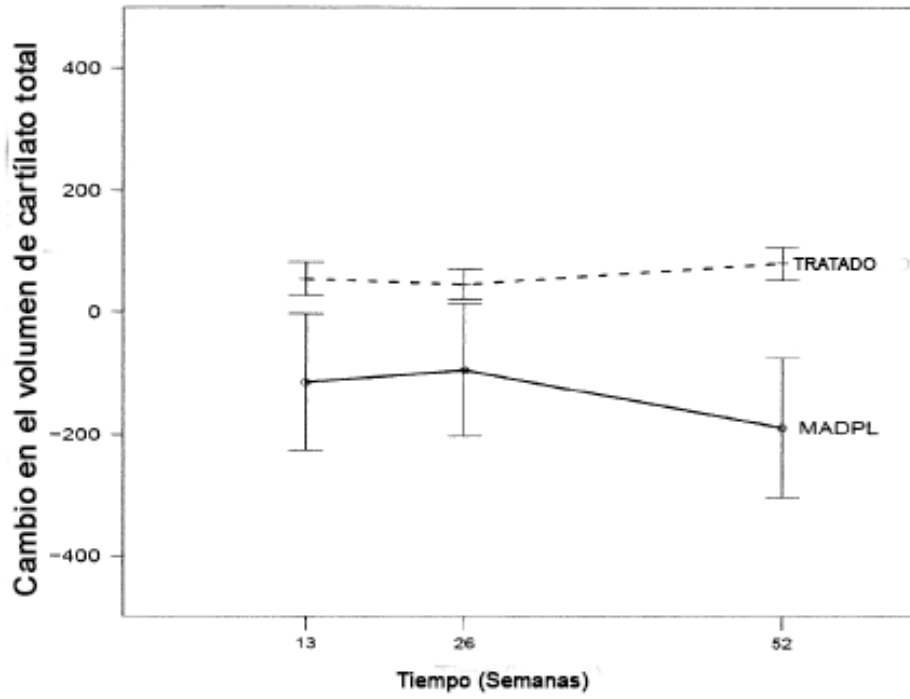


Fig. 14

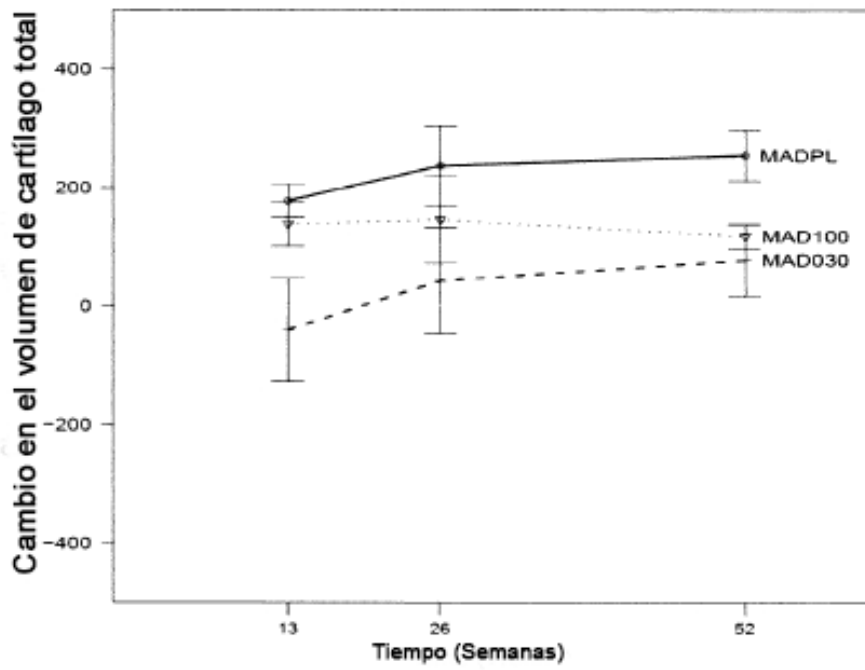


Fig. 15

SEQ ID NO.1: Secuencia de aminoácidos del FGF-18 humano nativo

Met Tyr Ser Ala Pro Ser Ala Cys Thr Cys Leu Cys Leu His Phe Leu
 Leu Leu Cys Phe Gln Val Gln Val Leu Val Ala Glu Glu Asn Val Asp
 Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser
 Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys
 His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly
 Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln
 Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe Tyr Leu Cys Met Asn Arg
 Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly Thr Ser Lys Glu Cys Val
 Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Met Ser Ala
 Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr Lys Lys Gly Arg Pro Arg
 Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln Asp Val His Phe Met Lys
 Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln Lys Pro Phe Lys Tyr Thr
 Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile Arg Pro Thr His Pro Ala

SEQ ID NO.2: Secuencia de aminoácidos del FGF-18 truncado recombinante (trFGF-18)

Met Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg
 Ala Arg Asp Asp Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr
 Ser Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser
 Ala Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr
 Asp Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe
 Tyr Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly
 Thr Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr
 Thr Ala Leu Met Ser Ala Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr
 Lys Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln
 Asp Val His Phe Met Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln
 Lys Pro Phe Lys Tyr Thr Thr Val Thr Lys

Fig. 16(a)

SEQ ID NO. 3: gen de IL1RN

gggcagctcc	accctgggag	ggactgtggc	ccaggctactg	cccgggtgct	actttatggg	60
cagcagctca	gttgagttag	agtctggaag	acctcagaag	acctcctgtc	ctatgaggcc	120
ctccccatgg	cttttagttaa	gctccttcca	ctctcatttt	ttcacctgag	aaatgagaga	180
ggaaaatgtc	tacaattggt	gtttatcaaa	tgctttcagg	ctctggtgag	caagcgtcca	240
ggaaaatgtc	aagcgcacatg	agctccaggc	ctgtctgggg	gatctgggca	cggggaggca	300
tccatgggag	accatgcagg	cactctgagg	caggggctgc	aagcctagtg	cctgctgggg	360
cagcaggtga	acagagaggt	gtaactgctg	tgacagaagt	catggagtc	ttggagtgtg	420
agggtcattt	tccactgttg	atagaatagg	gaaattggtg	aaatagccct	gttaaatgag	480
agaaaagaaca	gtgtgagctc	aatgagaaat	actaatagaa	tgtggcactg	agccacaagg	540
tctgagggtt	gattgataag	gaagggtggg	gactgtggag	aattaagggc	ttggcacagt	600
cagttccacc	agttgtcaca	agagaatgca	ggctcaggtg	gccagaactt	ctcgttttc	660
cagaagagtc	gatagattctg	atttcattat	atagattatt	ctgattaaac	cagacaataa	720
agcaagcaga	taaaatattt	aaattataag	ctgccagttt	gcaacctccg	gttaggattt	780
gtgtggggca	aagaaaaaaa	ctctcaggat	cattgggatg	tagactctaa	ttttaagttt	840
ctaatttaaa	attggccctt	gaggtggggc	gtggtggctc	acacctgtaa	tcccagcatt	900
ttgggaggcc	aaggtgggtg	gatctcttga	ggtcaagagt	tcaaggcctg	cctggccaac	960
atggtgaaac	cctgtctcta	ttaaaaatac	aaaaattagc	tgggcatggt	ggtgcatgct	1020
tgcaatctta	gctacttggg	tagctaaggc	aggagaattg	ctggaaccctg	ggaggtagag	1080
gttgacagtga	atggagatca	caccactgca	ctccagtctg	ggcaatagag	agagacgctc	1140
tcttaaaaaa	aaaatatgta	aagataaata	aaataggcct	ctaagtgaga	ctaatgagca	1200
ggccattctc	ctttctgggt	cttactttcc	ttgcaactct	ttctgggtgt	taagaggagg	1260
tctagaggaa	gctggacaac	tcttagcttg	tagtaagcac	agtggagtg	tcagctctta	1320
atgggtcatg	gacacgttac	aagctaggcg	ccttgctgag	cactttacat	ggtttatccc	1380
actgaaccct	ctcaataaac	ctatgaggaa	gggctattat	tgctcacatt	ttcagaagag	1440
gaaatggata	tagagagatt	agataatttg	ccatggcca	gacagctagt	ataagaggag	1500
gaggtggatt	gactgcagac	attctgtctt	caaaccacta	cactatgcta	tgggggcaca	1560
gagacttaat	gaaatcatgg	agaggggaat	tgctttgtca	accacaagca	gttattccgg	1620
gggcagcaga	tcctcccctg	tccccagtg	ggtacaatgg	tcctgggtgg	gttgtgctac	1680
aatgttagcc	cattgctctta	tgtgttttcc	aaatgtgtaa	agtaggatgc	tggaaaccact	1740
cttagaacca	gataccaata	cattgtgaag	aaataaatct	ctgtgcttaa	aaactggttca	1800
tcccataaata	ttttgaaactg	acacacaata	ggtgctaaat	aaatgtgtgt	taacttgaat	1860
tggattgaat	tcgggaaaaa	agtgcaataa	gcttagtgaa	gacaccatgt	tccttgggta	1920
gagaaaccac	attctccatc	taaggccagg	agtatgggag	gtatcaatgt	ttgccagca	1980
cagaacaggg	tgccaagaag	agaaaagtgg	acggggtgca	tactcggact	ggaaactgga	2040
agggtgagaa	cagagggtaa	aggatagaga	tggaaaccatg	tgcatacact	ttgtgttacc	2100
ttggacaagt	cattcatctt	tctggaccctc	tgctttctct	ctacacaatg	gggtcccacc	2160
acttccctta	cagctgactt	gtatgaagaa	ggagggtggag	gaggaggaga	aggtgaagac	2220
aatgctgact	caaagggtaa	attattttta	ggatccaagt	ttgaaaaaca	ttttaggcta	2280
ctagatatga	acaacatctt	gattatgtag	ttgaaggaaa	ttaaagatga	atggtttaat	2340
taaaaattaa	tcagaatgaa	aacgattgat	tactaatata	tctgcaatgg	tttattttcc	2400
tgagtggcag	actcactaag	gtttttgaa	actcctgtgt	gattgctcta	tgtatgtatg	2460
tatgatgta	tgatgcatg	tatctatcta	tatctgtctc	aaataaaatg	atcacatctc	2520
tgctaataaa	aacactacac	tggcagggtta	caattataat	cattaactgt	gcctggaatt	2580
tgcagcagca	gccaccagag	gtaccagtgc	cctttaaagg	ttcataatct	agaataatcc	2640
aattatctga	gtttttcagg	gactgagggg	tttggaagg	tgtagaactt	tcagtaataa	2700
agtcaagaaa	gtcctggaca	aaccaaggta	ggtggctact	ctagccata	accaggtaaa	2760
gagctttccc	tgtaacctgt	gtaaggtttt	agaatcattt	ctttccttat	tacaaaaaat	2820
cctccccaaa	ttttcaagaa	attatgaact	aaatagttac	tctatgagat	aggagtccag	2880
cccaaaagaa	acaccataag	aacaaatata	attcttgctt	atgttaacca	tgcaatgaag	2940
cagagagaaa	aagtccagtgg	cctctttagg	aggactgtag	tgtgggaaga	aataactaaa	3000
ctgggtttca	atcctggcct	ggccaggatc	tggagcaagt	gagttaatct	ttctaagcct	3060
tgagtagtgt	cttctctctc	ttctctctct	tcctccccct	tctcctcttc	ttctctctcc	3120
tccttctcct	cttctctctc	ttctctctct	tcctctctct	cttctctctc	ctcctctctc	3180
tcctctctct	cttctctctc	ttctctctct	tctctctctt	cttctctctc	ctcttattct	3240
tcttcatcgt	cttcgtcttc	gtcttctttt	tattttcaaa	gtgaaagcaa	gtttatttaag	3300
aaagtaaagg	aaataaaagaa	tggccactcc	atagacagag	tagcctgaac	cttgagttct	3360
tctataaagt	cactatgaat	ttatactcat	tttgaaagtg	ggtgtcaata	tgtctgtcca	3420
ctttgcacag	ctgttatgtg	gacaaaaagga	gatctgtgtg	aaagtgtaac	acagagccta	3480
aactataaca	ggtaagcaac	acagttgtcc	cttcccctat	ggtgtctgtt	cttctccatt	3540
tcctcctgtc	tgccagggga	ttataaaact	aatcatcaaa	gccaagaagg	caagagcaag	3600
catgtaccgc	tgaaaacaca	agataactgc	ataagtaatg	actttcagtg	cagattcata	3660
gctaaccctat	aaactgctgg	ggcaaaaatc	atcttggaag	gctctgaacc	tcagaaagga	3720
ttcacagtaa	gttaaccatg	tagatctgag	aggagagtag	cttctgtgag	ataacagttg	3780

Fig. 16(b)

ES 2 660 818 T3

gattatatac	catgtcctga	tccccttcat	catccaggag	agcagagggtg	gtcaccctga	3840
tagcagcaag	cctgggggct	gcagcttggg	gggtagagg	actcaggggt	acagatgtct	3900
ccaaacctgt	cctgctgcct	tagggagctt	ctaataagtt	gatggatttg	gttaaaatta	3960
acttggctac	ttggcaggac	ttggctcagtg	aggaccaaca	aaaagaagac	atcagattat	4020
accctggggg	tttgatattc	ttgtgtttct	ttctcttctt	tgtactaaaa	tatttaccca	4080
tgactgggaa	agagcaactg	gagcttttgt	agcattatct	tagcaaaaat	ttacaaaagt	4140
tgaaaacaaa	tattgcccac	attgtgtggg	gtgtcctgtg	acactcagga	ttcaagtgtt	4200
ggccgaagcc	actaaatgtg	agatgaagcc	attacaagcc	agtgtgcaca	tctgtccacc	4260
caagctggat	gccaacattt	cacaaatagt	gcttgctgta	cacaaatgca	gttccaggag	4320
gcccaaatga	aaatgtttgt	actgaaattt	gttaaagctt	cccgacaaac	tagatttatc	4380
agtaaggatt	gtttctgca	aggggatga	aacttgtggg	gtgagccatt	tgggctgagg	4440
aggagggagg	ttggagctga	gaaatgtgga	gacaatttcc	ctttagaagg	actgaatctc	4500
cctgctctc	ttgggtgctg	cagccagcag	gatccaatgg	tgtatatgtc	tccccagctc	4560
cccattcagt	gatatcatgt	cagtagcttg	aaattatccg	tgggtggagt	attatgtcat	4620
ggaaattggc	aaatggaaac	ttttattgga	gattcaattg	ttaaactttt	accagcaca	4680
cactgccctg	ccttcagagt	caatgacct	atccaagt	aatccatctg	tccactgtct	4740
ccaacacgat	ctttataaaa	cacacctgac	aacattacc	ttttattcag	tttttaaaa	4800
gataagtttc	cagctcatcg	ggctggcttt	aaaggccatt	tctcctctgg	acctcacc	4860
acttttcaaa	tcacttttcc	taccctacc	tctaaatgct	actcaaaact	cagccatcct	4920
gaataataag	acttttga	agtagattat	ggctgggca	cagtggctca	cacctgta	4980
cccagcactt	ttggaggcca	agatgggtgg	atcacctgag	gtcgggagtt	cgagaccagc	5040
ctgactaaca	tagtgaaacc	ctgtctctac	taaaaataca	aaattagtgt	ggggtgggtg	5100
cacaagcctg	taatcccagc	tactcaggag	gttgaggcag	gggaattgct	tgaacctggg	5160
aggcggaggt	ttgcggtgagc	ctagattgct	ccactgcact	ccagcctggg	caacaagagc	5220
gaaactccat	ctcaaaaaaa	taaataaata	aataaagtag	attacatcag	atacctctgg	5280
cctaggttgt	ttatgaccaa	ctctctgtct	gagaataact	agaaaagcta	gacaaaacat	5340
atttccaaaa	gatctctttg	gagccatcag	agaatggcca	aggctgtaag	gaactgcctg	5400
agcccagaga	gggtggagccc	agcactgggt	ccctttactc	ctggggacat	gtgctggttt	5460
caaaaacttc	agctgagttt	ttgagcattc	atggaacttg	gtgggggaga	tgaattttgt	5520
accttaaatc	ctgctacag	ggaggttccc	tgataatccc	caccaattt	ggaactctgg	5580
gtcagccttc	acaggtactg	aagccctcct	ctgaatgac	tcaagtctctg	ctagggtaga	5640
ggttacctgc	ttttgaaagg	ctcctggcct	acctgtgcag	caggagcaaa	agtgaacct	5700
ctcagggtag	agataacaat	catccagagc	cttgaatgac	ctctactgtg	cttaataat	5760
agtattcagc	agtcagtaaa	aaggatttag	gcacatgcaa	gatgacctgt	gtatcaggg	5820
gaaataggca	ataaattgag	atccagcagg	gatttgaatc	atggatttga	atcaggggca	5880
gccttcgaaa	gaaactgtgga	gaatatactc	agatttaaaa	cataagattg	gaatttttgg	5940
cagagaacta	acaactgtac	aaaaaaggaa	ccaaatggaa	atcctagaac	tgaagaatgc	6000
aattaaccga	ttgtgagaaa	tagccaacat	ctattgaa	cttccatgt	ggacagctgt	6060
gctaaacact	ttacaggcat	caacataaga	tgtgtcccct	tacagcagtg	cagtgtcccct	6120
cctaagacat	ggacagcctg	gtttccctat	ctctctgtct	catcaaaacc	ccctttacgtg	6180
gggcttagac	actcctgttg	tctctagtgt	ctagtagcac	agggctcagc	acatggaagc	6240
cactagatac	aatttgataa	ccaggacctc	cgatgaaagc	catgggtgct	gattgggaa	6300
gcattgtctt	ttatgtgcta	ttgtcttaaa	gcttcatcca	ggaagcagaa	ctcggggggg	6360
gctgaggacc	cagaaccgag	aataagatta	gtcagagatt	tctgtggggc	agaaatcata	6420
aggacgcaa	ctgtttgggt	gagataagac	gaaaccaaga	gtggacttgt	ggccagaagc	6480
gtgaggaaga	gggagagagc	ttcccttgtc	ccctttcttc	ctctccctaa	gccacagtga	6540
ttgacagccc	ccccctttg	gagtcagagc	aggcttgaga	ctggactggg	aaaggagggt	6600
gggtcaggat	acagagcag	aaggctggga	gtgcaggcca	ggagcaagg	gctggggcat	6660
tcattgtgct	tgatctctcc	cactttacct	gggttaaaga	agcatatgca	aaagccaagg	6720
tgtgagtatt	tcccagtgct	cagggtcagg	gcatgattca	tcacgtgcag	catttcattc	6780
aatccttata	gtaaccgatg	atgtggcttc	tattattagc	tctatcagat	aatgaaactg	6840
agaccaagac	aggctctgca	cattgtgtgg	ggtaatgaca	cagggggatt	cagacctaga	6900
ctccataact	cctgcccag	ggaccacccc	caccctcacc	ctgtgcatgt	cgacaaaagg	6960
cagactgggc	cacttctcag	gacacagcgg	ggaaatgaca	cagagcaggg	aggttccagg	7020
agcccagcag	gtcttttctc	caggagaata	ctctctgaat	tcagactggg	gtcagagaaa	7080
catttaccca	ggagccgcag	tgtgggtggg	gctttttact	tgaaacgctg	tctgaaggca	7140
gtggccagga	tgaaactctc	caccctacct	tggcaagcca	cttctctct	gcaatctgta	7200
aggacattgt	tgagagaatt	atggctcttc	aattccggag	ggttgaagaa	agacaaatag	7260
gagagaacct	atcatagtca	ggtgctagct	gccttctctt	tcagagagtg	tgagaataaa	7320
gtgatacact	tgattattag	caaatacttt	ggaaatttta	aacgctaata	ttcaaacac	7380
tctggaagag	gcaaaataag	agacaggttc	atatacatca	tctccttcag	ctagtctca	7440
caaaaaacaa	caaatgaata	aacaaaatc	ttctttggcc	ctcataggaa	gacactgttt	7500
cttgaacgtg	tttcaaaaag	gatgggtgac	tcactcaagg	tcacactgtt	tatgaggaca	7560
gtacaggaat	acagacatgc	cattttgctt	gaaaaatcc	atcaccag	gaggtgacac	7620

Fig. 16(c)

ES 2 660 818 T3

aat	ttt	cct	ctg	agg	ata	catt	ctt	taa	aac	ctt	7680
catt	cat	atag	ctt	cct	cctt	tga	agg	atta	act	ct	7740
ttt	gtt	gg	tt	g	g	g	g	g	g	g	7800
act	cat	caag	at	ca	act	gct	g	tag	tag	taa	7860
ctg	cc	ct	c	a	c	a	t	c	a	t	7920
ttt	gg	ag	at	g	a	t	g	a	g	a	7980
act	gc	g	a	c	c	t	c	t	c	t	8040
gg	at	t	a	c	a	g	g	a	g	a	8100
tc	ac	c	a	t	a	g	t	t	a	a	8160
ct	cc	cc	a	a	g	t	g	g	a	t	8220
aa	ac	a	c	a	a	a	a	a	a	a	8280
tt	gt	tt	gt	tt	gt	tt	gt	tt	gt	tt	8340
tg	ct	ct	ct	c	a	g	a	g	t	g	8400
a	a	g	c	c	c	c	c	c	c	c	8460
ct	g	t	g	t	g	a	c	a	g	a	8520
at	g	c	c	a	g	a	t	a	a	a	8580
at	g	c	t	t	c	t	g	c	a	t	8640
c	c	t	a	c	c	c	a	a	a	a	8700
a	a	t	a	t	t	g	t	a	a	a	8760
c	t	t	c	t	t	c	t	t	c	c	8820
c	c	a	t	t	t	g	t	a	a	a	8880
a	a	t	g	a	a	a	t	g	a	a	8940
t	a	g	a	c	c	a	a	a	a	a	9000
g	a	t	g	a	a	a	a	a	a	a	9060
a	t	c	a	g	g	g	t	c	a	a	9120
g	t	a	g	t	g	a	a	c	a	a	9180
a	c	a	g	c	t	g	a	c	a	a	9240
c	a	g	a	a	t	g	t	t	t	t	9300
a	g	t	g	a	c	a	t	c	a	a	9360
t	t	t	c	t	g	t	c	a	a	a	9420
c	a	g	t	a	g	g	a	a	a	a	9480
g	a	a	a	t	c	t	a	a	a	a	9540
t	c	c	a	t	t	g	c	a	a	a	9600
t	g	c	g	a	g	a	g	a	g	a	9660
g	a	g	t	g	a	c	t	a	c	a	9720
t	g	c	a	g	t	c	a	c	a	a	9780
t	t	c	t	g	t	t	c	a	a	a	9840
g	c	c	t	t	c	a	g	a	a	a	9900
a	a	c	a	t	a	c	a	c	a	a	9960
t	g	g	a	g	a	g	a	t	a	a	10020
g	t	t	c	a	a	a	a	a	a	a	10080
c	t	c	a	g	a	a	c	a	a	a	10140
t	t	g	a	a	t	g	t	g	c	a	10200
t	g	a	t	a	t	g	g	c	a	a	10260
g	g	t	t	c	c	c	c	c	c	c	10320
a	g	g	g	t	g	t	g	t	a	a	10380
a	g	a	g	c	c	t	g	a	a	a	10440
t	a	a	g	a	t	g	t	g	a	a	10500
a	t	t	c	a	g	c	a	g	a	a	10560
t	g	g	c	c	a	g	a	g	a	a	10620
a	t	a	t	g	g	g	a	c	a	a	10680
a	g	g	a	t	c	c	t	t	a	a	10740
t	a	g	a	a	c	t	a	a	a	a	10800
c	t	g	c	c	a	c	c	c	c	c	10860
t	a	g	c	c	a	c	a	c	a	c	10920
c	t	g	t	t	a	t	a	a	a	a	10980
a	a	g	a	a	a	g	a	a	a	a	11040
t	c	c	a	a	a	g	g	t	t	a	11100
t	c	t	a	g	g	a	a	a	a	a	11160
t	c	t	t	g	a	a	a	a	a	a	11220
a	t	a	c	t	t	a	a	a	a	a	11280
a	c	a	t	t	a	a	a	a	a	a	11340
a	c	a	a	a	c	a	t	t	c	c	11400
g	c	t	g	a	a	c	a	g	a	a	11460
a	a	a	t	g	t	g	g	c	c	a	11520

Fig. 16(d)

ES 2 660 818 T3

cctcagtctt	ctcatccatg	catgccgtgg	gtatactaaa	atactataacc	cctggaagag	11580
ctggatgcaa	atthgacaag	ttctggggga	cacaggaagg	tgccaagcac	aaggctgggc	11640
acatggtggc	tgtgcactac	agctgagtc	ttttcctttt	cagaatctgg	gatgttaacc	11700
agaagacctt	ctatctgagg	aacaaccaac	tagttgctgg	atacttgcaa	ggaccaaag	11760
tcaatthaga	aggtgagtg	ttgccaggaa	agccaatgta	tgtgggcata	acgtcacttt	11820
gcccgtctgt	ctgcagcagc	atggcctgcc	tgcaaaaacc	ctaggtgcaa	tgtcctaata	11880
cttggtgggt	ctttgtattc	aagtttgaag	ctgggagggc	ctggctactg	aagggcacat	11940
atgagggcag	cctgaagagg	gtgtggagag	gtagagtcta	ggtcagagg	cagtgcctat	12000
aggcacagtg	gtcccagggc	cacagctggg	aagggcaaat	accagaaggc	aaggttgacc	12060
attcccttcc	tcaagtgcct	attaaggctc	catgttccta	tgttgttcaa	accctaactc	12120
aatcccaaat	taatccacca	tgtataagg	tgagctatgt	ctcttattcc	tggacaccat	12180
actcagccat	attctggctc	acacattaaa	caagctggat	gacctgaag	aagcttcacc	12240
cactctgttc	ctcagcttcc	ccttcagtg	gatgatata	actggacaac	aggatgtg	12300
attcttttag	ttccagcctt	ccaggatggt	ttcactcccc	tgtttgttgt	tgtaggatgg	12360
tattacctcc	accttcccac	cttcctatg	ccctggttct	gtctcctgtg	cctcgctctg	12420
aaagtggatg	agacctataa	ttcctgtcct	gtagttctc	ctaataaaca	cactgaagca	12480
cgaggaaagt	gagatthttg	ttgtctacat	agagcatgga	ggcctcttag	ggagagagga	12540
ggttcagaga	ctcctaggct	cctgtggagc	cccactcatg	gccttgttca	ttttccctgc	12600
ccctcagcaa	cactcctatt	gacctggagc	acaggtatcc	tgggaaagt	gagggaaata	12660
tggacatcac	atggaacaac	atccaggaga	ctcaggcctc	taggagtaac	tggtagtgt	12720
gcactctggg	gaaagtgagg	gaaatatgga	catcacatgg	aaaacaatcc	aggagactca	12780
ggcctctagg	agtaactggg	tagtgtgcat	cctggggaaa	gtgagggaaa	tatggacatc	12840
acatggaaca	acatccagga	gactcaggcc	tctaggagta	actgggtagt	gtgcatcctg	12900
gggaaagtga	gggaaatatg	gacatcacat	ggaacaacat	ccaggagact	caggcctcta	12960
ggagtaactg	ggtagtgtgc	ttggtttaat	cttctattta	cctgcagacc	aggaagatga	13020
gacctctctg	cccttctgac	ctcgggattt	tagttttgtg	gggaccaggg	gagatagaaa	13080
aataccgggg	gtctcttcct	tattgtctgt	ccctcttcta	ttaacctgac	cctcccctct	13140
gttcttcccc	agaaaagata	gatgtggtac	ccattgagcc	tcatgctctg	ttcttgggaa	13200
tccatggagg	gaagatgtgc	ctgtcctgtg	tcaagtctgg	tgatgagacc	agactccagc	13260
tggaggtaaa	aacatgcttt	ggatctcaaa	tcaccccaaa	accagtggc	ttgaaacaac	13320
caaaatthtt	tcttatgatt	ctgtgggttg	accaggatta	gctgggtagt	tctgttccat	13380
gtggtggaac	atgctggggg	cactttggaa	gctgcattca	gcagagtgc	tggcttgccg	13440
tgggcatacca	aggtggtccc	tcctcctcca	ggctctcttt	ccatgtgatc	tctcagtgtt	13500
taagagttag	ttggagcttc	cttacagcat	ggcgctgac	ttccaaaagg	gattattcca	13560
aaaagagcct	caacatgcag	gcgcttatta	tgacttctgc	ttgcatcctc	ctattggcca	13620
aagccagtca	cgtggctaag	tctagcccc	tgtgagagga	gactgcataa	gagtgtgaac	13680
accaggagac	acggtcactg	ggggccacca	ctgtaaccat	ctaccacagg	acctgaatct	13740
ctgtgtgcta	ctcccttgct	caagggcccc	cctaccacag	cagacctgct	gtcttctagc	13800
aaagcccata	ctcaggacct	ttctcttcca	atctctattg	actcaaattg	attagttggt	13860
gctccacca	gagcctgtg	ctcctttatc	tcatgtaatg	ttaatgggtt	tcccagccct	13920
gggaaaacat	ggctttgtct	caggggcttg	ctggatgcaa	gcttaacctc	aatgtgagtg	13980
gccatactgt	ggcactgtcc	catccctcac	cagggacact	gctctggagg	gtgactgcct	14040
gttctgtgag	gagtggggat	ggctaggaca	ttgcatggaa	cacaccacca	ccccatcttc	14100
tcagagtcca	aacctgaca	gaacaccagc	tccacaggcc	ttggcttctg	ctgatgggtc	14160
cgtgtattta	ccagacttag	ttgtccaagg	ccagagtggc	cagatttccc	aaagtcaagg	14220
tgtgacagtg	ggacagcctc	tttgtgtctt	tgtgtccta	agaaacctgg	gccaggccag	14280
gcgcagtggc	tcacgcctgt	aatcccagca	ctttgagaag	ccaaggtggg	cagatcacga	14340
ggtcaggagt	ttgagaccag	cctggccaac	atggtgaaac	cctgtctcta	ttaaaaatag	14400
aaaacattag	acaggtgtgg	tgggtgatgc	ctgtaatccc	agctactcag	gaggetgagg	14460
caggagaatc	gcttgaacct	aggagtgga	ggttgcatg	agccgagatt	gtgccactgc	14520
actccagcct	aggcgacaga	gcaagactcc	gtctcgggaa	aattaattaa	taaataaata	14580
aacctaggct	ccagagtccc	acagaatggc	agacaggagc	acctgggggc	ttttagggta	14640
tggcatttcc	cctgtactaa	ctctgggctg	tccagagggc	catttcatgg	cgtggagtg	14700
agagggaggc	agcacaggac	ttcctaggcc	tcagctctca	cctgcccata	ttttgatttc	14760
caggcagtta	acatcactga	cctgagcgag	aacagaaagc	aggacaagcg	cttcgccttc	14820
atccgctcag	acagtggccc	caccaccagt	tttgaactct	ccgctgccc	cggttgggtc	14880
ctctgcacag	cgatggaagc	tgaccagccc	gtcagcctca	ccaatatgcc	tgacgaaggc	14940
gtcatggcca	ccaaattcta	cttccaggag	gacgagtagt	actgcccagg	cctgcctggt	15000
cccattcttg	catggcaagg	actgcagggg	ctgcccagtc	cctgcccata	gggtcccgg	15060
ctatgggggc	actgaggacc	agccattgag	gggtggacc	tcagaaggcg	tcacaacaac	15120
ctggtcacag	gactgtgctc	cctctcaac	tgaccagcct	ccatgctgcc	tccagaatgg	15180
tctttcta	gtgtgaaatc	gagcacagca	gcccctgca	aaagcccttc	catgtgcct	15240
ctgcattcag	gatcaaacc	cgaccacctg	cccaacctgc	tctcctcttg	ccactgcctc	15300
ttcctccctc	attccacctt	cccatgccc	ggtaccatca	ggccacttga	tgacccccaa	15360

Fig. 16(e)

ES 2 660 818 T3

```
ccaagtggct cccacaccct gttttacaaa aaagaaaaga ccagtccatg agggagggtt 15420
ttaagggtt gtggaatg aaaattagga ttcatgatt ttttttttc agtccccgtg 15480
aaggagagcc cttcatttg agattatgtt ctttcgggga gaggctgagg acttaaata 15540
ttcctgcatt tgtgaaatga tggatgaaagt aagtggtagc tttcccttc tttttcttct 15600
ttttttgtga tgtcccaact tgtaaaaatt aaaagttagt gtactatgtt agccccataa 15660
ttttttttt ctttttaaaa cacttccata atctggactc ctctgtccag gcactgctgc 15720
ccagcctcca agtccatct ccaactccaga ttttttacag ctgcctgcag tactttacct 15780
cctatcagaa gtttctcagc tcccaaggct ctgagcaaat gtggctcctg ggggttcttt 15840
cttctctgc tgaaggaata aattgctcct tgacattgta gagcttctgg cacttgaga 15900
cttgatgaa agatggctgt gcctctgcct gtctcccca cgggctggg agctctgcag 15960
agcaggaac atgactcgta tatgtctcag gtccctgcag ggccaagcac ctgcctcgc 16020
tcttggcagg tactcagcga atgaatgctg tatatgttg gtgcaaagtt ccctacttcc 16080
tgtgacttca gctctgtttt acaataaaat cttgaaatg ccta 16124
```

Fig. 16(f)

ES 2 660 818 T3

SEQ ID NO.4: Locus rs9005 de IL1RN

aaltaggatt	tcatgatttt	tttttttcag	tccccgtgaa	ggagagccct	tcatttggag	60
attatgttct	ttcgggggaga	ggctgaggac	ttaaaatatt	cctgcatttg	tgaaatgatg	120
gtgaaagtaa	gtggtagctt	ttcccttctt	tttcttcttt	ttttgtgatg	tccaacttg	180
taaaaattaa	aagttatggt	actatgttag	ccccataatt	tttttttcc	ttttaaaca	240
cttcataat	ctggactcct	ctgtccaggc	actgtgccc	agcctccaag	ctccatctcc	300
actccagatt	ttttacagct	gcctgcagta	ctttacctcc	tatcagaagt	ttctcagctc	360
ccaaggctct	gagcaaatgt	ggctcctggg	ggttctttct	tcctctgctg	aaggaataaa	420
ttgctccttg	acattgtaga	gcttctggca	cttgagact	tgtatgaaag	atggctgtgc	480
ctctgcctgt	ctccccacc	rggctgggag	ctctgcagag	caggaaacat	gactcgtata	540
tgtctcaggt	ccctgcaggg	ccaagcacct	agcctcgctc	ttggcaggta	ctcagcgaat	600
gaatgctgta	tatgttgggt	gcaaagtcc	ctacttctg	tgacttcagc	tctgttttac	660
aataaaatct	tgaaaatgcc	tatattgttg	actatgtcct	tggccttgac	aggctttggg	720
tatagagtgc	tgaggaaact	gaaagaccaa	tgtgtcttcc	ttaccccaga	ggctggcgcc	780
tggcctcttc	tctgagagtt	cttttcttcc	ttcagcctca	ctctccctgg	ataacatgag	840
agcaaatctc	tctgcaaaaa	agatatgggg	cagcactgtc	cacaacagcc	tctgctggaa	900
acaaccaag	caccatcac	agaatgaatt	agtacatcat	gtatctgcac	acaacacagt	960
gctccttggc	aaagaaaatg	aatgaattac	agccagctgc	a		1001

SEQ ID NO.5: Locus rs315952 de IL1RN

tcacgaggtc	aggagtttga	gaccagcctg	gccaacatgg	tgaaaccctg	tctctattaa	60
aaatagaaaa	cattagacag	gtgtggtggg	gcatgcctgt	aatcccagct	actcaggagg	120
ctgaggcagg	agaatcgctt	gaaccagga	ggtggaggtt	gcagtgagcc	gagattgtgc	180
cactgcactc	cagcctaggc	gacagagcaa	gactccgtct	cgggaaaatt	aattaataaa	240
taaataaacc	taggtcccag	agtcccacag	aatggcagac	aggagcacct	gggggctttt	300
agggatagtc	atttcccctg	tactaactct	gggctgtcca	gagggccatt	tcatggcgtg	360
gagtggagag	ggaggcagca	caggacttcc	taggcctcag	ctctcacctg	cccatctttt	420
gatttccagg	cagttaacat	cactgacctg	agcgagaaca	gaaagcagga	caagcgcttc	480
gccttcatcc	gctcagacag	yggccccacc	accagttttg	agtctgccc	ctgccccggg	540
tggttcctct	gcacagcgat	ggaagctgac	cagcccgtca	gcctcaccaa	tatgcctgac	600
gaaggcgtca	tggtcaccaa	atttacttcc	caggaggacg	agtagtactg	cccaggcctg	660
cctgttccca	ttcttgcatt	gcaaggactg	cagggactgc	cagtccccct	gccccagggc	720
tcccggctat	gggggactg	aggaccagcc	attgaggggt	ggaccctcag	aaggcgctcac	780
aacaacctgg	tcacaggact	ctgcctcctc	ttcaactgac	cagcctccat	gctgcctcca	840
gaatggtctt	tctaattgtg	gaatcagagc	acagcagccc	ctgcacaaag	cccttccatg	900
tcgcctctgc	attcaggatc	aaaccccgac	cacctgcccc	acctgctctc	ctcttgccac	960
tgcctcttcc	tcctcattc	caccttccca	tgccttggat	c		1001

Fig. 16(g)

SEQ ID NO.6: Región específica de locus rs9005 de IL1RN (correspondiente al tramo de nucleótido 415 a nucleótido 466 de SEQ ID NO.4), en donde n es A o G

<221> variación
 <222> (27)..(27)
 <223> n es a ó g
 ctgtgcctct gcctgtctcc cccaccnggc tgggagctct gcagagcagg aa 52

SEQ ID NO.7: Región específica de locus rs315952 de IL1RN (correspondiente al tramo de nucleótido 415 a nucleótido 466 de SEQ ID NO.5), en donde n es C o T

<221> variación
 <222> (27)..(27)
 <223> n es a ó g
 cgcttcgcct tcatccgctc agacagnggc cccaccacca gtttgagtc tg 52

SEQ ID NO.8: cebador 1 de rs315952

gcttcgcctt catccgctca gagac 25

SEQ ID NO.9: cebador 2 de rs315952

ggccccacca ccagttttga gtctg 25

SEQ ID NO.10: cebador 1 de rs9005

tgtgcctctg cctgtctccc ccacc 25

SEQ ID NO.11: cebador 2 de rs9005

ggctgggagc tctgcagagc aggaa 25

Fig. 16(h)