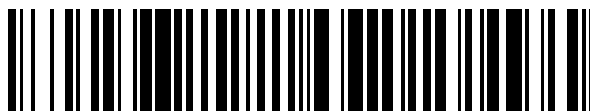


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 929**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2013 PCT/EP2013/066422**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.02.2014 WO14023704**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2013 E 13745418 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2880181**

54 Título: **Biomarcadores para el pronóstico de trastornos del cartílago**

30 Prioridad:

**06.08.2012 EP 12179393
07.08.2012 US 201261680493 P
13.03.2013 US 201361778950 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.03.2019

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 2 702 929 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

Biomarcadores para el pronóstico de trastornos del cartílago

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, a la farmacogenética, más específicamente a marcadores genéticos asociados con la gravedad de un trastorno del cartílago o la evolución de dicho trastorno del cartílago. La presente invención se refiere más en particular a genes humanos que pueden utilizarse para el diagnóstico y el tratamiento de trastornos del cartílago.

Antecedentes de la invención

10 Trastornos del cartílago se refiere en términos generales a enfermedades caracterizadas por una degeneración de anomalías metabólicas en los tejidos conectivos, que 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 traumatismo o una lesión. Entre otras cosas, los trastornos del cartílago incluyen osteoartritis (OA) y lesiones del cartílago (incluyendo lesiones deportivas del cartílago y las articulaciones, o lesiones quirúrgicas tales como una o más microfracturas). El cartílago maduro tiene una capacidad limitada de repararse a sí mismo, en particular porque
15 los condrocitos maduros tienen poco potencial de proliferación y debido a la ausencia de vasos sanguíneos. Además, el cartílago no está bien nutrido y tiene una presión de oxígeno baja. El reemplazo del cartílago dañado, en particular del cartílago articular, causado bien por una lesión, bien por una enfermedad, es un enorme reto para los médicos, y se considera que los procedimientos de tratamiento quirúrgico disponibles no son completamente previsible y son eficaces sólo durante un tiempo limitado. Por lo tanto, la mayoría de los pacientes más jóvenes no
20 busca tratamiento, o se les recomienda aplazar el tratamiento todo lo posible. Cuando el tratamiento es necesario, el procedimiento estándar depende de la edad y varía entre un reemplazo articular total, un trasplante de trozos de cartílago o una técnica de estimulación medular (tal como una microfractura). La microfractura es un procedimiento común que implica una penetración en el hueso subcondral para estimular un depósito de cartílago por células madre obtenidas de la médula ósea. Sin embargo, se ha demostrado que esta técnica no repara suficientemente el defecto condral y el nuevo cartílago formado es mayormente fibrocartilago, lo que tiene como resultado una función y una biomecánica inadecuadas o alteradas. De hecho, el fibrocartilago no tiene la misma durabilidad y puede no adherirse correctamente al cartílago hialino circundante. Por este motivo, el nuevo fibrocartilago sintetizado puede fallar más fácilmente (plazo previsto: 5-10 años).

30 Para los pacientes con osteoartritis, el tratamiento no quirúrgico consiste en particular en terapia física, modificación de los hábitos de vida (por ejemplo reducción de la actividad), dispositivos de apoyo, fármacos orales e inyectados (por ejemplo fármacos antiinflamatorios no esteroideos) y gestión médica. Una vez que fallan estos tratamientos, la cirugía, tal como un reemplazo articular, es la opción principal para los pacientes. Tal opción puede proporcionar una reducción de síntomas que por lo general son sólo de corta duración. Las osteotomías tibiales o femorales (cortar el hueso para reequilibrar el desgaste articular) pueden reducir síntomas, ayudar a mantener hábitos de vida activos y
35 retrasar la necesidad de un reemplazo articular total. El reemplazo articular total puede aliviar los síntomas de la osteoartritis avanzada, pero por lo general requiere un cambio en los hábitos de vida y/o el nivel de actividad del paciente.

Actualmente, los tratamientos con fármacos existentes en el mercado están dirigidos principalmente a aliviar el dolor. Aún no existe un tratamiento comercialmente disponible que restaure los daños del cartílago (véase Lotz, 2010).

40 El factor de crecimiento fibroblástico 18 (FGF-18) es un miembro de la familia FGF de proteínas, estrechamente relacionado con FGF-8 y FGF-17. Se ha demostrado que FGF-18 es un agente proliferativo para los condrocitos y los osteoblastos (Ellsworth et al., 2002; Shimoaka et al., 2002). FGF-18 ha sido propuesto para el tratamiento de trastornos del cartílago tales como la osteoartritis y lesiones del cartílago, bien solo (WO2008/023063), bien en combinación con ácido hialurónico (WO2004/032849).

45 Sprifermin, que es una forma trunca del FGF-18 humano, está siendo investigado en ensayos clínicos para el tratamiento tanto de la osteoartritis como de las lesiones del cartílago (para más detalles, véanse por ejemplo los documentos NCT01033994, NCT00911469 y NCT01066871). La pauta posológica actual para sprifermin es una vez a la semana durante 3 semanas (un ciclo de tratamiento), administrándose el fármaco a través de inyecciones intraarticulares. Este ciclo de tratamiento puede repetirse. Esta pauta posológica se ha descrito en el documento
50 WO2008023063.

Actualmente, los tratamientos de la OA y las lesiones de cartílago con cualquier fármaco, en particular fármacos anabolizantes tales como sprifermin, durante ensayos clínicos, se proporcionan a los pacientes sin información predictiva en cuanto a la respuesta, es decir sin tener conocimiento de si el tratamiento tiene probabilidades de ser altamente eficaz, ser moderadamente eficaz, mostrar sólo un pequeño efecto o no mostrar ningún efecto.
55 Actualmente, por ejemplo, una población numerosa de pacientes tratados muestra una respuesta intermedia/alta al tratamiento según las puntuaciones WOMAC con FGF18 después de al menos un ciclo de tratamiento, pero algunos otros no responden a dicho tratamiento o responden presentando al mismo tiempo una puntuación WOMAC alta en comparación con el control.

La presente invención describe marcadores genéticos que pronostican la gravedad del trastorno o la evolución del trastorno. Tales marcadores son útiles para identificar, a través de una detección selectiva genética antes del tratamiento, subgrupos de pacientes que tienen mayor probabilidad de mostrar una forma menos grave de trastorno del cartilago. Tal información de pronóstico puede por lo tanto ser clínicamente útil para guiar decisiones médicas.

5 Compendio de la invención

La presente invención está dirigida a un método para pronosticar la gravedad de un trastorno, o la evolución de un trastorno, en un individuo que tenga osteoartritis, comprendiendo el método las etapas de:

a. determinar, a partir de una muestra de ácido nucleico, la presencia del genotipo G/G en IL-1RN rs9005 y T/T en IL-1RN rs31595;

10 b. pronosticar a partir del resultado de la etapa a. una forma menos grave de osteoartritis.

La presente invención describe también un método para pronosticar la gravedad de un trastorno, o la evolución de un trastorno, en un individuo que tenga osteoartritis, comprendiendo el método las etapas de:

a. determinar, a partir de una muestra de ácido nucleico, la ausencia del genotipo G/G en IL-1RN rs9005 y T/T en IL-1RN rs31595;

15 b. pronosticar a partir del resultado de la etapa a. una forma más grave de osteoartritis.

Debe entenderse que, en todos los métodos o usos mencionados en la presente memoria, antes de determinar el genotipo en un locus, es necesario obtener una muestra de ácido nucleico (o una muestra de ensayo) de dicho individuo, por ejemplo recogiendo sangre o saliva. Como alternativa, la muestra de ensayo se selecciona entre células bucales, orina o deposiciones. Preferiblemente, la muestra de ácido nucleico es una muestra de ADN.

20 Además, también debe entenderse que todos los métodos o usos mencionados en la presente memoria se llevan a cabo *in vitro* y no en el cuerpo animal o humano.

Definiciones

- El concepto "fármaco" o "compuesto terapéutico" significa un compuesto que se utiliza actualmente o que podría utilizarse en la terapia de un trastorno del cartilago.

25 - El concepto "compuesto anabolizante" o "fármaco anabolizante" debe entenderse como un compuesto o un fármaco que tiene un efecto anabolizante en el cartilago, que preferiblemente lleva a una reparación del cartilago. Entre tales compuestos pueden enumerarse el compuesto FGF-18 (como se define en la presente memoria), BMP-2 (por ejemplo referencia Uniprot P12643), BMP-7 (por ejemplo referencia Uniprot P18075), GDF-5 (por ejemplo referencia Uniprot P43026), FGFβ (por ejemplo referencia Uniprot P09038), FGF-8 (por ejemplo referencia Uniprot P55075), FGF-9 (por ejemplo referencia Uniprot P31371), intensificadores de SOX-9 (por ejemplo referencia Uniprot P48436 para SOX-9) o TGFβ (por ejemplo referencia Uniprot P01137) y cualesquiera variantes de los mismos.

30 - El concepto "compuesto de FGF-18" o "FGF-18", tal como se utiliza en la presente memoria, se pretende que sea una proteína que mantenga al menos una actividad biológica de la proteína FGF-18 humana. FGF-18 puede ser nativa, hallarse en su forma madura o en una forma truncada de la misma. Las actividades biológicas de la proteína FGF-18 humana incluyen en particular el aumento de la actividad osteoblástica (véase el documento WO98/16644) o de la formación de cartilago (véase el documento WO2008/023063). La FGF-18 humana nativa, o de tipo silvestre, es una proteína expresada por condrocitos del cartilago articular. La FGF-18 humana se denominó en primer lugar zFGF-5 y se describe con todo detalle en el documento WO98/16644. La SEQ ID n°: 1 corresponde a la secuencia de aminoácidos de la FGF-18 humana nativa, con un péptido señal que consiste en residuos de aminoácido 1(Met) a 27(Ala). La forma madura de la FGF-18 humana corresponde a la secuencia de aminoácidos desde el residuo 28(Glu) hasta el residuo 207(Ala) de SEQ ID n°: 1 (180 aminoácidos). El término incluye también una proteína de fusión, estando la proteína FGF-18 acoplada a una proteína heteróloga o a un compuesto químico.

35 FGF-18 puede producirse mediante métodos recombinantes, tales como los expuestos por la solicitud WO2006/063362. Dependiendo de las condiciones y los sistemas de expresión, FGF-18 se expresa en una célula hospedadora recombinante con un residuo de metionina (Met) inicial o con una secuencia señal para la secreción. Cuando se expresa en un hospedador procariota, tal como en *E. coli*, FGF-18 contiene un residuo Met adicional en el extremo N-terminal de su secuencia. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la FGF-18 humana, cuando se expresa en *E. coli*, comienza con un residuo Met en el término N (posición 1) seguido de los residuos 28 (Glu) a 207 (Ala) de SEQ ID n°: 1.

40 - El concepto "forma truncada" de FGF18, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una proteína que comprende o que consiste en los residuos 28(Glu) a 196(Lys) de SEQ ID n°: 1. Preferiblemente, la forma truncada de la proteína FGF-18 es el polipéptido denominado "trFGF-18" (170 aminoácidos), que comienza con un residuo Met (en el extremo N-terminal), seguido de los residuos de aminoácido 28 (Glu) - 196 (Lys) de la FGF-18 humana de tipo silvestre. La secuencia de aminoácidos de trFGF-18 se muestra en SEQ ID n°:2 (los residuos de aminoácido 2 a

170 de SEQ ID nº:2 corresponden a los residuos de aminoácido 28 a 196 de SEQ ID nº:1). trFGF-18 es una forma truncada recombinante de FGF-18 humana, producida en E. coli (véase el documento WO2006/063362). La Denominación Común Internacional (DCI) para esta forma concreta de FGF-18 es sprifermin. Se ha demostrado que sprifermin muestra actividades similares a las de la FGF-18 humana madura, por ejemplo aumenta la proliferación de condrocitos y el depósito de cartílago, lo que lleva a una reparación y reconstrucción en diversos tejidos cartilaginosos (véase el documento WO2008/023063).

- “Trastorno del cartílago”, tal como se utiliza en la presente memoria, abarca trastornos resultantes de daños debidos a lesiones, tales como lesiones traumáticas, condropatía o artritis. Los ejemplos de trastornos del cartílago que pueden tratarse mediante la administración de la formulación de FGF-18 descrita en la presente memoria incluyen, pero no están restringidos a artritis, tal como osteoartritis, lesiones del cartílago, fracturas que afecten a cartílago articular o procedimientos quirúrgicos con repercusiones en cartílago articular (por ejemplo microfractura). Este concepto abarca también enfermedades degenerativas/trastornos degenerativos del cartílago o de las articulaciones, tales como condrocalcinosis, policondritis, policondritis recidivante, espondilitis anquilosante o costochondritis. La International Cartilage Repair Society ha propuesto un sistema de clasificación artroscópico para evaluar la gravedad del defecto del cartílago: grado 0: cartílago sano (normal), grado 1: el cartílago tiene un punto blando o ampollas, grado 2: desgarros de poca importancia visibles en el cartílago, grado 3: las lesiones tienen surcos profundos (más de un 50 % de la capa de cartílago) y grado 4: el desgarramiento del cartílago expone el hueso subyacente (subcondral) (véase por ejemplo la página 13 de http://www.cartilage.org/_files/contentmanagement/ICRS_evaluation.pdf).

- El término “osteoartritis” se utiliza refiriéndose a la forma más común de artritis. El término “osteoartritis” abarca tanto osteoartritis primaria como osteoartritis secundaria (véase por ejemplo The Merck Manual, 17ª edición, página 449). La forma más común de clasificar la osteoartritis es el uso de la escala de clasificación radiográfica de Kellgren-Lawrence (véase la tabla siguiente). La osteoartritis puede estar causada por la rotura del cartílago. Pueden romperse trozos de cartílago, que pueden causar dolor e hinchazón en una articulación entre huesos. Con el tiempo, el cartílago puede desgastarse por completo y los huesos rozarán uno con otro. La osteoartritis puede afectar a cualquier articulación, pero normalmente afecta a las manos y a las articulaciones que soportan peso tales como las caderas, las rodillas, los pies y la 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 pueden tratarse administrando los compuestos de FGF-18.

La escala de clasificación radiográfica de la osteoartritis de Kellgren-Lawrence se describe de la siguiente manera:

Grado de osteoartritis	Descripción
0-Ninguna	Sin hallazgos radiográficos de osteoartritis
1-Dudosa	Estrechamiento dudoso del espacio articular y posible rebordeado con osteófitos
2-Mínima	Osteófitos claros, estrechamiento claro del espacio articular
3-Moderada	Múltiples osteófitos moderados, estrechamiento claro del espacio articular, algo de esclerosis y posible deformidad del contorno del hueso
4-Grave	Osteófitos grandes, estrechamiento pronunciado del espacio articular, esclerosis grave y deformidad clara del contorno del hueso

- El concepto “lesiones del cartílago” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un trastorno del cartílago o a daños en el cartílago resultantes en particular de un traumatismo. Las lesiones del cartílago pueden producirse en particular después de una destrucción mecánica traumática, en particular después de un accidente o una cirugía (por ejemplo cirugía de microfractura). Este concepto “lesiones del cartílago” incluye también la fractura condral u osteocondral, los daños en el menisco y el término microfractura. Se consideran incluidas también en esta definición las lesiones relacionadas con el deporte o el desgaste relacionado con el deporte de tejidos de la articulación.

- El concepto “gravedad de la enfermedad” está relacionado con el grado del trastorno del cartílago: cuanto mayor, más grave. Por ejemplo, un grado 3 según el sistema de clasificación de Kellgren-Lawrence es más grave que un grado 2 según el mismo sistema de clasificación.

- El concepto RIA (reacción inflamatoria aguda) tal como se utiliza en la presente memoria se define de la siguiente manera. Dentro de un periodo de 1 a 7 días, preferiblemente dentro de un periodo de 3 días, después de la inyección intraarticular de compuesto de FGF-18 en la rodilla objetivo han de cumplirse los dos criterios siguientes:

- Hinchazón autodeclarada (derrame de líquido sinovial)

- Aumento del dolor en 30 mm sobre una escala visual analógica (EVA) de 100 mm

- 5 - Un "alelo" es una forma concreta de un gen, de un marcador genético o de otro locus genético, que puede distinguirse de otras formas del gen, del marcador genético o del otro locus genético; por ejemplo, sin limitación por su secuencia de nucleótidos concreta. El término alelo incluye también por ejemplo, sin limitación, una forma de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés). Un individuo puede ser homocigótico para un determinado alelo en células diploides; es decir el alelo es idéntico en ambos cromosomas apareados; o heterocigótico para dicho alelo; es decir los alelos no son idénticos en ambos cromosomas apareados.
- 10 - El concepto "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).
- 15 - Un "polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)" es una variación en la secuencia de ADN que se produce cuando un solo nucleótido –A (para adenina), T (para timina), C (para citosina) o G (para guanina)– en el genoma (u otra secuencia compartida entre individuos de una especie) difiere entre individuos de una especie (o entre cromosomas apareados en un individuo). Un SNP va frecuentemente precedido y seguido de secuencias altamente conservadas en la población de interés y por lo tanto la localización de un SNP se hace típicamente en referencia a una secuencia de ácidos nucleicos consensuada de treinta a sesenta nucleótidos que incluyen el locus del marcador genético, que a veces se denomina secuencia de contexto para el SNP. Los SNP analizados por los presentes inventores en conexión con el tratamiento del trastorno del cartílago con sprifermin son los mostrados en la Tabla 1.
- 20 - Un "genotipo" tal como se utiliza 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 (homólogos) apareados en un individuo. "Genotipo", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere también a la combinación de alelos de más de un locus genético, por ejemplo sin limitación de SNP, en un par o más de un par de cromosomas homólogos en un individuo.
- 25 - El término "haplotipo" se refiere a variantes o alelos de marcadores distintos (por ejemplo SNP) que están localizados conjuntamente en el mismo cromosoma. Los datos de genotipo de SNP, medidos a partir de conjuntos ordenados de SNP o ensayos Taqman, no están en fase (es decir el precursor de origen del cromosoma es desconocido para cada alelo). Los métodos computacionales (Browning et Browning, 2011) utilizan información de varios individuos para estimar (es decir deducir) la fase de haplotipo a partir de los datos de genotipo.
- El término "genotipado" se refiere a un proceso para determinar un genotipo de un individuo, bien para un solo SNP, bien para muchos SNP.
- 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 puede denominarse, en el marco de la presente invención, bien "IL-1RN rs9005", bien "locus IL-1RN rs9005". Lo mismo es aplicable para IL-1RN rs315952. Como es evidente para el experto, a partir de la base de datos NCBI para estos SNP, el genotipo que se ha de determinar tanto en IL-1RN rs9005 como en IL-1RN rs315952 es el que se halla en la posición 27 de cada uno de estos loci, es decir la posición
- 35 27 de SEQ ID n°:6 y la posición 27 de SEQ ID n°:7.
- El término "SNP1" en el contexto de la presente invención es la posición 27 de SEQ ID n°: 6, también identificado como rs9005 en la base de datos NCBI. SEQ ID n°: 6 es una parte de secuencia de ácidos nucleicos genómicos del antagonista del receptor de interleucina 1 (IL-1RN). Los términos "IL-1RN rs9005", "rs9005" o "SNP1" se utilizan de manera intercambiable.
- 40 - El término "SNP2" se refiere a la posición 27 de SEQ ID n°: 7 identificada como rs315952 en la base de datos NCBI. SEQ ID n°: 7 es una parte de secuencia de ácidos nucleicos genómicos de IL-1RN. Los términos "IL-1RN rs315952" "rs315952" o "SNP2" se utilizan de manera intercambiable.
- 45 - El término "sonda" o "cebador" se refiere a un oligonucleótido, es decir un ácido nucleico o un derivado de ácido nucleico; incluyendo sin limitación un ácido nucleico bloqueado (LNA, por sus siglas en inglés), un ácido nucleico peptídico (PNA, por sus siglas en inglés) o un ácido nucleico con puente (BNA, por sus siglas en inglés); tiene normalmente entre 5 y 100 bases contiguas de longitud y lo más frecuentemente 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 o 20-25 bases contiguas de longitud. La secuencia de una sonda/un cebador puede estar diseñada para hibridarse específicamente con una de las formas alélicas de un marcador genético; tales oligonucleótidos se denominan sondas específicas de alelo. Si el marcador genético es un SNP, el alelo complementario para ese SNP puede encontrarse en cualquier
- 50 posición dentro de una sonda específica de alelo. Otras sondas/otros cebadores útiles en la práctica de la invención se hibridan específicamente con una región diana adyacente a un SNP con su extremo 3' situado a entre uno y menos de, o igual a, aproximadamente 10 nucleótidos del locus de marcador genético, preferiblemente ≤ aproximadamente 5 nucleótidos. Tales sondas/cebadores que se hibridan de manera adyacente a un SNP son útiles
- 55 en métodos de extensión de cebador mediada por polimerasa y se denominan en la presente memoria "oligonucleótidos de extensión de cebador". En una realización preferida, el extremo 3' de un oligonucleótido de extensión de cebador es un desoxinucleótido complementario al nucleótido situado inmediatamente adyacente a un SNP.

- El término “polimorfismo” se refiere a dos o más formas alternas (alelos) en una población de un locus genético que se diferencian en la secuencia de nucleótidos o que tienen números variables de unidades de nucleótido repetidas. Los polimorfismos se dan en regiones codificadoras (exones), regiones no codificadoras de genes o fuera de genes (regiones intergénicas). Los diferentes alelos de un polimorfismo se dan típicamente con diferentes frecuencias en una población, denominándose a veces alelo “principal” o “de tipo silvestre” el alelo que se da con mayor frecuencia en una población seleccionada. Los organismos diploides pueden ser homocigóticos o heterocigóticos para los diferentes alelos que existen. Un polimorfismo bialélico tiene dos alelos.

- El término “epistasia” se utiliza en general para definir la interacción entre genes. La epistasia fue definida en primer lugar por Bateson (Bateson et Mendel, 1909) para describir un efecto de enmascaramiento por el que una variante o un alelo en un locus impide que la variante en otro locus manifieste su efecto. 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 SNP distintos. Esto es similar a la definición propuesta por Fisher en 1918 (Fisher, 1918), es decir una desviación de la aditividad en el efecto de alelos en diferentes loci con respecto a su contribución a un fenotipo.

- Las “puntuaciones WOMAC totales” o “puntuaciones WOMAC” (“WOMAC” por “Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index”) miden el dolor (puntuación WOMAC de dolor), la función (puntuación WOMAC de función) y la rigidez (puntuación WOMAC de rigidez). Cuando se aplican para evaluar el dolor y la disfunción asociados con las lesiones del cartílago, consisten en un cuestionario que contiene 24 elementos divididos en 3 subescalas (5 elementos para dolor, 2 elementos para rigidez y 17 elementos para función física) (véase Bellamy et al., 1988; Wolfe, 1999). Es un instrumento muy conocido y de uso generalizado en particular en la evaluación de la gravedad de la OA.

- Las mediciones de volumen de cartílago se realizaron mediante mediciones por imagen de resonancia magnética (IRM), incluyendo el volumen total de cartílago (LFTC + MFTC), el volumen lateral de cartílago (también denominado LFTC (por sus siglas en inglés): compartimento femorotibial lateral), el volumen medial de cartílago (también denominado MFTC (por sus siglas en inglés): compartimento femorotibial medial) y el nuevo promedio total de espesor de cartílago.

- El término “base” significa antes del tratamiento (es decir al entrar en el estudio). Se refiere en particular a variables clínicas, tales como, pero sin limitarse a, el volumen de cartílago y la puntuación WOMAC total de un determinado paciente al entrar en el estudio (es decir antes del tratamiento con compuesto de FGF-18 o placebo).

- “Sensibles” son pacientes que muestran una respuesta a un tratamiento de un trastorno del cartílago con un fármaco, preferiblemente un fármaco anabolizante, tal como FGF-18. Preferiblemente, los pacientes sensibles (o pacientes que muestran sensibilidad al tratamiento) presentan en particular un mayor aumento del volumen total de cartílago que los individuos tratados con placebo, es decir que muestran reparación de cartílago. Además, los pacientes sensibles presentan una mejora en las puntuaciones WOMAC totales al menos similar a la de los placebos. Los conceptos “supersensibles”, “con sensibilidad intermedia” y “no sensibles” se refieren a los diferentes grupos de pacientes que dependen en particular del aumento del volumen de cartílago después del tratamiento con fármaco. Los supersensibles muestran una gran respuesta (es decir una gran reparación de cartílago) al tratamiento con dicho fármaco, los individuos con sensibilidad intermedia muestran una respuesta buena o intermedia (es decir reparación buena o intermedia de cartílago) al tratamiento con dicho fármaco, y los no sensibles no muestran ninguna respuesta o muestran poca respuesta al tratamiento con dicho fármaco. Tanto los individuos supersensibles como los sensibles tienen una mejora en la puntuación WOMAC total similar a la de los placebos. A la inversa, los individuos que no muestran respuesta tienen una mejora en la puntuación WOMAC total significativamente menor que los placebos. Los términos “supersensibles” o “altamente sensibles” se utilizan de manera intercambiable. Hay que señalar que se ha demostrado que los supersensibles presentan un mayor riesgo de acontecimientos RIA.

Más en particular, los conceptos “con sensibilidad intermedia”, “supersensibles” y “no sensibles” incluyen, pero no se limitan a los diferentes grupos de pacientes que dependen del aumento del volumen de cartílago y la mejora de la puntuación WOMAC total, después del tratamiento con fármaco.

Los criterios propuestos para los sensibles son los siguientes:

1. Aumento positivo del cartílago (entre +10 y +100 mm³) en comparación con la base.
2. Cambio en aumento de cartílago significativamente mayor que cambio en placebo (por ejemplo comprobado con un ajuste de modelo lineal para IMC, grado KL, sexo y edad y con alfa = 5 %).
3. Mejora de la puntuación WOMAC, es decir disminución (por ejemplo más de 5 puntos de reducción) en comparación con la base.
4. Cambio en la puntuación WOMAC no significativamente mayor que cambio en placebo (por ejemplo comprobado con un ajuste de modelo lineal para IMC, grado KL, sexo y edad y con alfa = 5 %).

Los criterios propuestos para los supersensibles son los mismos que para los sensibles, pero con un aumento de cartílago mayor de 100 mm³ (criterio nº 1) en comparación con la base.

Los no sensibles pueden definirse como individuos que no cumplen los criterios nº 1 o nº 2 y que no cumplen los criterios nº 3 o nº 4.

- 5 Los individuos con sensibilidad intermedia muestran una respuesta buena o intermedia (o una sensibilidad buena o intermedia) al tratamiento con dicho fármaco (véanse los criterios anteriores; por ejemplo mediana del cambio cuando son tratados con un compuesto de FGF-18: +84,81 mm³ de aumento del volumen total de cartílago en comparación con la base; mediana del cambio: -20 puntos en la puntuación WOMAC total en comparación con la base; y diferencia no significativa en la puntuación WOMAC total en comparación con los placebos). Los
- 10 supersensibles muestran una gran respuesta al tratamiento con dicho fármaco (véanse los criterios anteriores; por ejemplo, mediana del cambio cuando son tratados con un compuesto de FGF-18: +119,46 mm³ de aumento del volumen total de cartílago en comparación con la base, lo que representa un 40,85 % de aumento (es decir beneficio) en comparación con los individuos sensibles, mediana del cambio: -10 puntos en la puntuación WOMAC total, ambos en comparación con la base, y diferencia no significativa en la puntuación WOMAC total en
- 15 comparación con los placebos). Los no sensibles no muestran ninguna respuesta o muestran poca respuesta al tratamiento con dicho fármaco (véanse los criterios anteriores; por ejemplo, mediana del cambio cuando son tratados con un compuesto de FGF-18: aumento significativamente menor en el volumen total de cartílago en comparación con los placebos (diferencia entre medianas: -106,64 mm³); cartílago total; pequeña mejora (mediana del cambio: -1 punto) en puntuaciones WOMAC totales en comparación con la base, y diferencia significativa en la
- 20 puntuación WOMAC total en comparación con los placebos).

- La "respuesta" o "sensibilidad" a un tratamiento con un fármaco debe entenderse como 1 año después de la primera inyección y medirse como 1) aumento del volumen de cartílago, medido gracias a IRM o rayos X por ejemplo, 2) disminución de las puntuaciones WOMAC totales y 3) cambios en las puntuaciones WOMAC totales no significativamente mayores que los de los placebos (remitirse también a la definición de "sensible").

- 25 - Un "biomarcador de pronóstico" informa sobre el estado del individuo, incluyendo y sin limitarse a la evolución de la enfermedad, la gravedad de la enfermedad o el resultado de la enfermedad, sin tener en cuenta cualesquiera terapias. Un "biomarcador predictivo" informa sobre el efecto de una terapia recibida, incluyendo y sin limitarse a los resultados en cuanto a eficacia y seguridad. Las definiciones de pronóstico y predictivo no son mutuamente excluyentes, por lo que un biomarcador puede ser tanto de pronóstico como predictivo.

- 30 - Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "MAD" (por sus siglas en inglés) significa dosis múltiple ascendente. Cuando a este acrónimo le sigue una cifra, la cifra corresponde a la dosis en la que el fármaco ha sido inyectado durante el tratamiento. Por ejemplo, MAD100 se refiere a un tratamiento durante el cual un paciente ha recibido 100 mcg de dicho fármaco (por ejemplo compuesto de FGF-18) por inyección. Las siglas "PL" (y "MADPL") se refieren a placebo.

- 35 - El concepto "dispositivo de almacenamiento", tal como se utiliza en la presente memoria, se pretende que incluya cualquier aparato informático o de procesamiento adecuado u otro dispositivo configurado o adaptado para almacenar datos o información. Los ejemplos de aparatos electrónicos incluyen aparatos informáticos independientes, redes de telecomunicaciones de datos, incluyendo redes de área local (LAN, por sus siglas en inglés), redes de área extendida (WAN, por sus siglas en inglés), Internet, intranet y extranet, y sistemas de procesamiento por ordenador locales y distribuidos. Los dispositivos de almacenamiento también incluyen, pero no se limitan a: medios magnéticos de almacenamiento, tales como disquetes, medios de almacenamiento en disco duro, cinta magnética, medios ópticos de almacenamiento tales como CD-ROM, DVD, medios electrónicos de almacenamiento tales como RAM, ROM, EPROM, EEPROM y similares, discos duros generales, e híbridos de estas categorías tales como medios magnéticos/ópticos de almacenamiento.
- 40

- 45 - Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "almacenado" se refiere a un proceso para codificar información en el dispositivo de almacenamiento. Los expertos pueden adoptar fácilmente cualquiera de los métodos actualmente conocidos para registrar información sobre medios conocidos para generar productos manufacturados que comprendan información sobre el nivel de expresión.

Descripción detallada de la invención

- 50 Existe necesidad de pronosticar la gravedad de la enfermedad, o la evolución de la enfermedad, en un individuo que tenga un trastorno del cartílago. Por lo tanto, los biomarcadores que predicen la propensión a la enfermedad, la gravedad de la enfermedad o la evolución de la enfermedad son importantes. Estos biomarcadores se denominan típicamente biomarcadores de pronóstico y son independientes del tratamiento recibido por los pacientes. Los biomarcadores de pronóstico pueden ser también predictivos de la respuesta a un tratamiento con un fármaco y, a la
- 55 inversa, los biomarcadores predictivos pueden ser también de pronóstico.

Para optimizar el tratamiento de dichos pacientes, es importante identificar biomarcadores que puedan utilizarse como predictores de la gravedad de la enfermedad. Dichos predictores podrían ser útiles también para identificar grupos de alto riesgo que o sean no sensibles o sean por el contrario supersensibles a un tratamiento con fármaco.

Por ejemplo, si de un paciente que tiene osteoartritis se sabe que tiene un alto riesgo de no responder a un fármaco determinado, preferiblemente un fármaco anabolizante, el médico puede decidir no proponer dicho fármaco a dicho paciente. Por el contrario, si de un paciente que tiene osteoartritis se sabe que tiene un alto riesgo de ser supersensible a un tratamiento con un fármaco, el médico puede decidir adaptar la pauta posológica con el fin de disminuir la dosis de dicho fármaco que se ha de administrar a dicho paciente. Tal información predictiva puede ser clínicamente útil para guiar decisiones, y en particular sobre el momento oportuno para una cirugía de reemplazo articular si es necesario.

El sorprendente hallazgo de la presente invención está basado en un estudio destinado a identificar biomarcadores potenciales asociados con la gravedad de una enfermedad, así como con el riesgo de ser sensible o no sensible a un tratamiento con un fármaco, preferiblemente un fármaco anabolizante tal como sprifermin. Los biomarcadores utilizados en este estudio se componían tanto de marcadores genéticos candidato (véase la Tabla 1) como de menos de 1 millón de SNP que cubren el genoma humano con una mediana de separación de marcadores de 680 bases. Se evaluó la asociación entre los marcadores genéticos y la gravedad de la enfermedad o las variables de respuesta clínica. El fundamento subyacente a este tipo de análisis era identificar biomarcadores que pudieran pronosticar la gravedad de la enfermedad, en un paciente con un trastorno del cartílago, o predecir el resultado clínico, para un paciente que haya de ser tratado con un fármaco, preferiblemente un fármaco anabolizante. Estos SNP podrían utilizarse para estratificar y adoptar como objetivo poblaciones de pacientes específicas.

Los inventores han descubierto sorprendentemente una asociación con ciertos biomarcadores (o SNP) y la gravedad o el resultado de una enfermedad, así como los efectos adversos de una terapia con fármaco. Interesan especialmente los SNP IL-1RN rs9005 y rs315952, situados ambos en el gen IL1RN (véase la Figura 1).

Estos biomarcadores han sido descritos en la bibliografía como posiblemente relacionados con la gravedad y la evolución de la enfermedad en pacientes de OA (véanse por ejemplo los documentos WO2009/135218, US2012115137 o Attur et al., 2010), utilizando un haplotipo (así llamado haplotipo C-T-A) que incluye rs419598 (C), rs315952 (T) y rs9005 (A). El documento WO2009/135218 describe también que un individuo que tenga al menos el genotipo (o el par de alelos) G/G en IL-1RN rs9005 y/o T/T o C/C en IL-1RN rs315952 puede ser propenso a una evolución grave de la enfermedad, mientras que un individuo que tenga al menos el genotipo T/T en IL-1RN rs315952 y/o A/A o G/A en IL-1RN rs9005 puede estar protegido contra la evolución a una enfermedad grave. De manera similar, el documento US2012115137 propone que un individuo que tenga el genotipo T en IL-1RN rs419598, G/G en IL-1RN rs9005 y T/T en IL-1RN rs315952 puede ser propenso a una evolución grave de la enfermedad.

Curiosamente, aunque la bibliografía muestra que se necesita el haplotipo C-T-A para poder predecir el riesgo de tener y desarrollar una enfermedad grave, un hallazgo de la presente invención es que sólo dos de estos biomarcadores, es decir rs9005 y rs315952, son suficientes para identificar pacientes que tengan menos riesgo de tener y desarrollar una forma grave de OA, pero también están fuertemente correlacionados con la respuesta a un tratamiento con un fármaco, tal como un fármaco anabolizante. No sólo son suficientes para identificar a tales pacientes, sino que también son más eficaces para dicho pronóstico que el haplotipo C-T-A. El tercer SNP, es decir rs419598, no parece tener mayor implicación en el fenotipo observado, aunque se haya descrito en la técnica anterior, que la de estar enlazado a los otros dos SNP. Otra diferencia entre el haplotipo C-T-A y la combinación de rs9005 y rs315952 es que el primero corresponde a efectos aditivos del alelo situado en la misma fase (mismo cromosoma hereditario), mientras que la última corresponde a efectos epistáticos (es decir la interacción entre alelos bien de la misma fase, bien de una fase diferente).

En particular, se descubrió que un genotipo T/T del biomarcador rs315952 junto con G/G del biomarcador rs9005 está asociado con una forma menos grave de osteoartritis (es decir forma menos grave de la OA en la base y evolución menos grave de la OA). Los individuos de un grupo placebo que llevaban esta combinación de genotipos tienen un crecimiento de cartílago significativamente mayor y una mejora de las puntuaciones WOMAC significativamente mayor, en comparación con los placebos de otras combinaciones de genotipo. Unos análisis adicionales, en la base, demostraron que los individuos (de cualquier pauta posológica durante el tratamiento con sprifermin, incluyendo placebos) que llevaban este genotipo IL-1RN rs9005 G/G e IL-1RN rs315259 T/T estaban protegidos contra una clasificación Kellgren-Lawrence de grado 3 y por lo tanto protegidos contra un estado de osteoartritis más avanzado/grave.

Así pues, la presente invención está dirigida a un método para pronosticar la gravedad del trastorno, en un individuo que tenga osteoartritis, comprendiendo el método las etapas de:

- a. determinar, a partir de una muestra de ácido nucleico, el genotipo en ambos loci IL-1RN rs9005 e IL-1RN rs315952;
- b. pronosticar, a partir del resultado de la etapa a., la gravedad del trastorno.

Antes de determinar el genotipo en un locus, es necesario obtener una muestra de ácido nucleico de dicho individuo, por ejemplo recogiendo sangre o saliva. Preferiblemente, la muestra de ácido nucleico es una muestra de ADN. Así pues, la presente invención está dirigida a un método para pronosticar la gravedad del trastorno, en un individuo que

tenga osteoartritis, comprendiendo el método las etapas de:

- a. determinar, a partir de una muestra de ácido nucleico, el genotipo en ambos loci IL-1RN rs9005 e IL-1RN rs315952;
- b. pronosticar, a partir del resultado de la etapa b., la gravedad del trastorno.

5 Según dicho método, la presencia del genotipo G/G en IL-1RN rs9005 y T/T en IL-1RN rs315952 es predictiva de una forma menos grave de osteoartritis. Se deduce que los pacientes que tienen este genotipo serán también propensos a una enfermedad/evolución del trastorno menos grave. Por el contrario, la ausencia del genotipo G/G en IL-1RN rs9005 y T/T en IL-1RN rs315952 es predictiva de una forma más grave de osteoartritis.

10 La presente descripción está dirigida también a un método para determinar la gravedad del trastorno, o la evolución del trastorno, en un individuo humano que tenga un trastorno del cartílago, comprendiendo el método las etapas de: (a) someter una muestra de ensayo de dicho individuo, al que se le ha diagnosticado un trastorno del cartílago, a al menos un ensayo de genotipado que determina los genotipos de al menos dos loci, siendo dichos al menos dos loci: (i) SNP1 y (ii) SNP2, (b) determinar los genotipos de dichos al menos dos loci; (c) determinar, a partir de los resultados de las etapas (a) y (b), la gravedad del trastorno, o la evolución del trastorno, para dicho individuo.

15 Según dicho método, la presencia del genotipo G/G en IL-1RN rs9005 (SNP1) y T/T en IL-1RN rs315952 (SNP2) es predictiva de una forma menos grave de trastorno del cartílago. Se deduce que los pacientes que tienen este genotipo serán también propensos a una enfermedad/evolución del trastorno menos grave. En la presente memoria se describe también un ensayo para determinar la gravedad del trastorno, o la evolución del trastorno, en un individuo humano que tenga un trastorno del cartílago, comprendiendo el ensayo: (a) someter una muestra de
20 ensayo de dicho individuo humano, al que se le ha diagnosticado un trastorno del cartílago, a al menos un ensayo de genotipado que determina los genotipos de al menos dos loci, siendo dichos al menos dos loci: (i) SNP1 y (ii) SNP2, (b) determinar los genotipos de dichos al menos dos loci; (c) determinar, a partir de los resultados de las etapas (a) y (b), la gravedad del trastorno, o la evolución del trastorno, para dicho individuo.

25 Según dicho método, la presencia del genotipo G/G en IL-1RN rs9005 (SNP1) y T/T en IL-1RN rs315952 (SNP2) es predictiva de una forma menos grave de trastorno del cartílago. Se deduce que los pacientes que tienen este genotipo serán también propensos a una enfermedad/evolución del trastorno menos grave.

Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto también que los alelos "A" del biomarcador rs9005 junto con "C" del biomarcador rs315952 están asociados con una mejor respuesta a un tratamiento con un fármaco, preferiblemente un fármaco anabolizante, tal como sprifermin, en individuos que sufren de un trastorno del cartílago.
30 Estos individuos se denominan supersensibles o altamente sensibles.

Por el contrario, los presentes inventores han descubierto también sorprendentemente que el genotipo rs315952 T/T junto con rs9005 G/G está asociado con una ausencia de respuesta, o una respuesta pequeña, a un tratamiento con un fármaco, preferiblemente un fármaco anabolizante, tal como sprifermin, en individuos que sufren de lesiones del cartílago. Estos individuos se denominan no sensibles.

35 Por lo tanto, un hallazgo de los inventores es que los loci polimórficos IL-1RN rs9005 e IL-1RN rs315952 pueden utilizarse en combinación como biomarcadores predictivos de la respuesta de un individuo a un tratamiento con un fármaco. En una realización concreta, se predecirá que el individuo es no sensible al tratamiento con el fármaco si tiene el genotipo IL-1RN rs9005 G/G junto con IL-1RN rs315952 T/T. Por el contrario, se predecirá que el individuo es supersensible (o altamente sensible) al tratamiento con el fármaco si tiene el genotipo IL-1RN rs9005 A/G o A/A
40 junto con IL-1RN rs315952 T/C o C/C. En cualquier otro caso (es decir G/G en rs9005 junto con T/C o C/C en rs315952 o A/G o A/A en rs9005 y T/T en rs315952), se predecirá que el paciente es sensible (o tiene una sensibilidad intermedia) al tratamiento con el fármaco.

Por lo tanto, estos dos biomarcadores rs315952 y rs9005 (también denominados biomarcadores cuando están en combinación) no sólo pronostican, sino que, lo que es más importante, predicen la respuesta de los pacientes a un
45 tratamiento con un fármaco.

En la presente memoria se describe también un método para predecir la sensibilidad a un fármaco antes de administrar el fármaco en un individuo que tenga un trastorno del cartílago, comprendiendo el método las etapas de:

- a. determinar, a partir de una muestra de ácido nucleico, el genotipo en ambos loci IL-1RN rs9005 e IL-1RN rs315952; y
- b. predecir, a partir del resultado de la etapa a., una sensibilidad alta, intermedia, baja o inexistente de dicho individuo a dicho fármaco.

50

Antes de determinar el genotipo en un locus, es necesario obtener una muestra de ácido nucleico de dicho individuo, por ejemplo recogiendo sangre o saliva. Preferiblemente, la muestra de ácido nucleico es una muestra de ADN. Así pues, en la presente memoria se describe un método para predecir la sensibilidad a un fármaco antes de administrar

el fármaco en un individuo que tenga un trastorno del cartílago, comprendiendo el método las etapas de:

- a. obtener una muestra de ácido nucleico de dicho individuo;
- b. determinar, a partir de dicha muestra de ácido nucleico, el genotipo en ambos loci IL-1RN rs9005 e IL-1RN rs315952;
- 5 c. predecir, a partir del resultado de la etapa b., una sensibilidad alta, intermedia, baja o inexistente de dicho individuo a dicho fármaco.

Según dicho método, la presencia del genotipo G/G en IL-1RN rs9005 y T/T en IL-1RN rs315952 es predictiva de una sensibilidad baja o inexistente a dicho fármaco. Así pues, se predecirá que el paciente es no sensible. Por el contrario, la presencia del o de los genotipos seleccionados del grupo que consiste en (1) IL-1RN rs9005 G/G e IL-1RN rs315952 T/C o C/C y (2) IL-1RN rs9005 A/G o A/A e IL-1RN rs315952 T/T, T/C o C/C es predictiva de sensibilidad a dicho fármaco. En particular, la presencia del genotipo A/A o A/G en IL-1RN rs9005 y C/C o C/T en IL-1RN rs315952 es predictiva de una alta sensibilidad (gran respuesta) a dicho fármaco. Así pues, se predecirá que estos pacientes son supersensibles. De dicha predicción se deduce que el médico puede seleccionar fácilmente sólo los pacientes de los que se haya predicho que son sensibles, incluyendo los supersensibles.

En la presente memoria se describe también un ensayo para determinar la sensibilidad a un tratamiento con un fármaco o para determinar un régimen de tratamiento con un tratamiento con fármaco, comprendiendo el ensayo: (a) someter una muestra de ensayo de un individuo humano, al que se le ha diagnosticado un trastorno del cartílago, a al menos un ensayo de genotipado que determina los genotipos de al menos dos loci, siendo dichos al menos dos loci: (i) SNP1 y (ii) SNP2, (b) determinar los genotipos de dichos al menos dos loci; (c) seleccionar un paciente como sensible a un tratamiento con dicho fármaco cuando se determine la presencia de al menos una de las siguientes combinaciones de SNP: (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID n°: 6; y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de la SEQ ID n°: 7; o (ii) SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T/ en el complemento de la SEQ ID n°: 6; y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de la SEQ ID n°: 7, o (iii) SNP1 genotipo A/G o A/A, o T/C o T/T en el complemento de la SEQ ID n°:6 y SNP2 genotipo T/C o C/C, o A/G o G/G en el complemento de la SEQ ID n°:7 y (d) opcionalmente tratar al paciente seleccionado en la etapa (c) con dicho fármaco.

Cuando el ensayo anterior se lleva a cabo para determinar un régimen de tratamiento con un fármaco, la etapa (c) es opcional, mientras que la etapa (d) se realiza preferiblemente, o se realiza.

En la presente memoria se describe además un ensayo para determinar la no sensibilidad a un tratamiento con un fármaco, comprendiendo el ensayo: (a) someter una muestra de ensayo de un individuo humano, al que se le ha diagnosticado un trastorno del cartílago, a al menos un ensayo de genotipado que determina los genotipos de al menos dos loci, siendo dichos al menos dos loci: (i) SNP1 y (ii) SNP2, (b) determinar los genotipos de dichos al menos dos loci; (c) seleccionar un paciente como no sensible a un tratamiento con dicho fármaco cuando se determine la presencia de las siguientes combinaciones de SNP: SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID n°: 6; y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de la SEQ ID n°: 7, y (d) opcionalmente tratar al paciente seleccionado en la etapa (c) con un compuesto terapéutico distinto de dicho fármaco.

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

También se describe un método para seleccionar pacientes con un trastorno del cartílago para su inclusión en un tratamiento, o ensayo clínico, con un fármaco, o su exclusión del mismo, sobre la base de la probabilidad de su respuesta a dicho tratamiento, que comprende:

- a. determinar, a partir de una muestra de ácido nucleico, el genotipo en ambos loci IL-1RN rs9005 e IL-1RN rs315952, en donde el genotipo del paciente con respecto a dichos loci es predictivo sobre el riesgo de que el paciente sea sensible o no sensible a dicho fármaco y
- 45 b. seleccionar los pacientes sensibles como adecuados para dicho tratamiento o ensayo clínico.

Antes de determinar el genotipo en un locus, es necesario obtener una muestra de ácido nucleico de dicho individuo, por ejemplo recogiendo sangre o saliva. Preferiblemente, la muestra de ácido nucleico es una muestra de ADN. Así pues, en la presente memoria se describe un método para seleccionar pacientes con un trastorno del cartílago para su inclusión en un tratamiento, o ensayo clínico, con un fármaco, o su exclusión del mismo, sobre la base de la probabilidad de su respuesta a dicho tratamiento, que comprende:

- a. obtener una muestra de ácido nucleico de dicho individuo,
- b. identificar, a partir de dicha muestra de ácido nucleico, el ácido nucleico del paciente en ambos loci polimórficos que consisten en IL-1RN rs9005 e IL-1RN rs315952, en donde el genotipo del paciente con respecto a dichos loci es predictivo sobre el riesgo de que el paciente sea sensible o

no sensible a dicho tratamiento y

- c. seleccionar los pacientes sensibles como adecuados para dicho tratamiento o ensayo clínico.

Según dicho método, los pacientes que tienen el genotipo IL-1RN rs9005 G/G e IL-1RN rs315952 T/T, de los que se ha predicho que son no sensibles, preferiblemente se excluyen del tratamiento con el fármaco o del ensayo clínico.

- 5 Los otros pacientes (los pacientes sensibles, incluyendo los supersensibles) pueden seleccionarse como adecuados para el tratamiento, o ensayo clínico, y por lo tanto pueden tratarse con el fármaco.

Como alternativa, el método para seleccionar un paciente con un trastorno del cartílago para su inclusión en un tratamiento o ensayo clínico con un fármaco o su exclusión del mismo, sobre la base de la probabilidad de la sensibilidad del paciente a dicho fármaco, comprendía las etapas de: (a) someter una muestra de ensayo de un individuo humano, al que se le ha diagnosticado un trastorno del cartílago, a al menos un ensayo de genotipado adaptado para determinar los genotipos de al menos dos loci, siendo dichos al menos dos loci: (i) SNP1 SNP2, siendo SNP2 la posición 27 de la SEQ ID n°: 7 identificada mediante rs315952, siendo la SEQ ID n°: 7 una parte de la secuencia de ácidos nucleicos genómicos del antagonista del receptor de interleucina 1 (IL-1RN); y (b) detectar, a partir de los genotipos de dichos al menos dos loci, la presencia de una combinación de genotipos seleccionada entre: (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID n°: 6; y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de la SEQ ID n°: 7; o (ii) SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T/ en el complemento de la SEQ ID n°: 6; y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de la SEQ ID n°: 7, o (iii) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID n°: 6 y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de la SEQ ID n°: 7; y (c) seleccionar un paciente para su inclusión en un tratamiento o ensayo clínico con dicho fármaco cuando se detecten las condiciones (i) o (ii) sobre la base del reconocimiento de que las combinaciones de genotipo (i) y (ii) están asociadas con una respuesta a dicho fármaco, y excluir al paciente del tratamiento o ensayo clínico con dicho fármaco cuando se detecte la condición (iii) sobre la base del reconocimiento de que la combinación de genotipos (iii) está asociada con una respuesta inadecuada a un tratamiento con dicho fármaco.

El método para seleccionar un individuo humano para un ensayo clínico para ensayar un fármaco puede, como alternativa, comprender las etapas de: (a) someter a ensayo una muestra biológica de un individuo humano al que se le ha diagnosticado un trastorno del cartílago en cuanto al menos los siguientes dos polimorfismos de un solo nucleótido: (i) SNP1 y (ii) SNP2; (b) determinar los genotipos de los SNP; (c) seleccionar para el ensayo clínico el individuo humano que lleve uno de los siguientes genotipos en dichos SNP: (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID n°: 6; y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de la SEQ ID n°: 7; o (ii) SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T/ en el complemento de la SEQ ID n°: 6; y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de la SEQ ID n°: 7, o (iii) un individuo humano que no lleve SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID n°: 6 y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de la SEQ ID n°: 7.

En la presente memoria se describe también un método para excluir a un individuo humano de un ensayo clínico en el que se ensaye un fármaco, comprendiendo el método las etapas de: (a) someter a ensayo una muestra biológica de un individuo humano al que se le ha diagnosticado un trastorno del cartílago en cuanto al menos los siguientes dos polimorfismos de un solo nucleótido: (i) SNP1 y (ii) SNP2; (b) determinar los genotipos de los SNP; (c) excluir del ensayo clínico al individuo humano que lleve el siguiente genotipo en dichos SNP: SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID n°: 6 y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de la SEQ ID n°: 7; o excluir del ensayo clínico al individuo humano que no lleve cualquiera de los dos siguientes genotipos de SNP: (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID n°: 6; y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de la SEQ ID n°: 7; o (ii) SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T/ en el complemento de la SEQ ID n°: 6; y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de la SEQ ID n°: 7.

Además del hallazgo de que, en función de su genotipo, el individuo podría clasificarse como supersensible, sensible o no sensible, se ha descubierto sorprendentemente que el mismo genotipo también es predictivo de acontecimientos adversos, tales como RIA. De hecho, posteriores investigaciones y análisis de los polimorfismos SNP demostraron una relación entre los marcadores rs9005 y rs315952, en combinación, con acontecimientos adversos en la clínica, con datos de IRM relativos al beneficio estructural y con beneficios sintomáticos determinados utilizando el cuestionario WOMAC. Estos SNP no sólo pueden utilizarse como herramienta predictiva de la respuesta del paciente a un tratamiento con un fármaco a nivel del volumen de cartílago, sino que también pueden utilizarse como herramienta predictiva de su riesgo de desarrollar acontecimientos adversos tales como RIA. Así pues, el perfil: "beneficio estructural vs. efectos adversos potenciales" de una terapia con un fármaco sería útil para determinar una mejor razón riesgo/beneficio, es decir un mejor resultado con un menor riesgo de efectos secundarios en los pacientes.

Esto está de hecho basado en el hallazgo de que los supersensibles tienen puntuaciones WOMAC mayores y una probabilidad mayor de tener un acontecimiento RIA, en particular por ejemplo cuando un fármaco, tal como un compuesto de FGF-18, se utiliza en una dosis de 100 mcg, en comparación con pacientes tratados con el placebo. De manera similar, los no sensibles tienen también puntuaciones WOMAC altas, en cualquier dosis, en comparación con los pacientes tratados con el placebo. También se ha demostrado que, contrariamente a los resultados con una dosis de 100 mcg, los supersensibles tratados con dicho fármaco (tal como un compuesto de FGF-18) en una dosis menor, por ejemplo de 30 mcg, tienen puntuaciones WOMAC menores (es decir una mayor mejoría WOMAC) y una

probabilidad menor de tener un acontecimiento RIA. En vista de estos resultados, puede ser útil seleccionar los pacientes sobre la base de su probabilidad de responder/no responder a un tratamiento con un fármaco en combinación con su nivel de riesgo de presentar acontecimientos adversos: los no sensibles podrían ser excluidos de un tratamiento que es probable que no funcione para ellos (véase el método de selección anterior), y los supersensibles pueden ser individuos para un régimen de tratamiento alternativo.

Así pues, también se describe un método para seleccionar pacientes con un trastorno del cartílago para un régimen terapéutico alternativo con un fármaco, sobre la base de su probabilidad de ser supersensibles a dicho tratamiento con el fármaco, que comprende identificar el ácido nucleico del paciente en ambos loci polimórficos seleccionados del grupo que consiste en IL-1RN rs9005 e IL-1RN rs315952, en donde el genotipo del paciente con respecto a dichos loci es predictivo sobre el riesgo de que el individuo sea supersensible a un tratamiento con dicho fármaco y permite la selección de dicho paciente para un régimen terapéutico alternativo que sea adecuado para dicho paciente, régimen terapéutico alternativo en el que la dosis de fármaco que se ha de administrar está reducida en comparación con la dosis de fármaco que se ha de administrar a un paciente del que se ha predicho que es sensible, pero no supersensible, a dicho tratamiento con el fármaco.

En la presente memoria se describe también un método para seleccionar un paciente con un trastorno del cartílago para un régimen de tratamiento modificado con un fármaco sobre la base de la probabilidad de que dicho paciente tenga acontecimientos de reacción inflamatoria aguda (RIA) cuando es tratado con dicho compuesto, comprendiendo el método las etapas de (a) detectar, a partir de una 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 detecte una combinación de 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 la SEQ ID nº: 7.

Por consiguiente, los pacientes que tengan el genotipo IL-1RN rs9005 A/G o A/A e IL-1RN rs315952 T/C o C/C, de los que se ha predicho que son supersensibles, se seleccionan preferiblemente para un régimen terapéutico alternativo en el que la dosis de fármaco que se ha de administrar está reducida.

En la presente memoria se describe también un método para seleccionar pacientes con un trastorno del cartílago para un régimen terapéutico alternativo con un fármaco, sobre la base de su probabilidad de tener acontecimientos RIA cuando son tratados con dicho fármaco, que comprende determinar, a partir de una muestra de ácido nucleico, el genotipo en ambos loci IL-1RN rs9005 e IL-1RN rs315952, en donde el genotipo del paciente con respecto a dichos loci es predictivo sobre el riesgo del individuo de desarrollar acontecimientos RIA en respuesta a un tratamiento con dicho fármaco y permite la selección de dicho paciente para un régimen terapéutico alternativo que sea adecuado para dicho paciente, régimen terapéutico alternativo en el que la dosis de fármaco que se ha de administrar está reducida en comparación con la dosis de fármaco que se ha de administrar a un paciente que (1) según la predicción sea sensible y (2) no presente riesgo de desarrollar acontecimientos RIA.

Por consiguiente, los pacientes que tengan el genotipo A/G o A/A en IL-1RN rs9005 y T/C o C/C en IL-1RN rs315952, de los que se ha predicho que son supersensibles, se seleccionan preferiblemente para un régimen terapéutico alternativo en el que la dosis de fármaco que se ha de administrar está reducida, en comparación con el régimen terapéutico normal, es decir el régimen terapéutico para un paciente del que se haya predicho que es sensible a un tratamiento con un fármaco, pero que no presente riesgo de desarrollar acontecimientos RIA.

En la presente memoria se describe además un ensayo para seleccionar un régimen de tratamiento para un individuo humano con un trastorno del cartílago, comprendiendo el ensayo: (a) someter una muestra de ensayo del individuo humano, al que se le ha diagnosticado un trastorno del cartílago, a al menos un ensayo de genotipado que determina los genotipos de al menos dos loci, siendo dichos al menos dos loci: (i) SNP1 y (ii) SNP2; (b) detectar, a partir de los genotipos de dichos al menos dos loci, la presencia de una combinación de genotipos seleccionada entre: (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID nº: 6; y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de la 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 la SEQ ID nº: 7; o (iii) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID nº: 6 y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de la SEQ ID nº: 7; y (c) seleccionar, y opcionalmente administrar, un régimen de tratamiento que comprende una cantidad eficaz de un fármaco cuando se detecte la condición (i) o (ii) sobre la base del reconocimiento de que las combinaciones de genotipos (i) y (ii) están asociadas con una respuesta a dicho fármaco, y excluir el régimen de tratamiento que comprende dicho fármaco cuando se detecte la condición (iii) sobre la base del reconocimiento de que la combinación de genotipos (iii) está asociada con una respuesta inadecuada a un tratamiento con dicho fármaco.

También se describe un método para tratar a un individuo humano con un trastorno del cartílago, que comprende administrar una composición que comprende una cantidad eficaz de un fármaco a un individuo humano, al que se le ha diagnosticado un trastorno del cartílago y del que posteriormente se ha determinado que lleva la combinación de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) seleccionada entre: (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID nº: 6, siendo SNP1 la posición X de la SEQ ID nº: 6 identificada mediante rs9007, siendo la SEQ ID nº: 6 una parte de secuencia de ácidos nucleicos genómicos del antagonista del receptor de interleucina 1 (IL-1RN); y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de la 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 la SEQ ID nº: 7,

siendo SNP2 la posición X de la SEQ ID nº: 7 identificada mediante 317972, siendo la SEQ ID nº: 7 una parte de secuencia de ácidos nucleicos genómicos del antagonista del receptor de interleucina 1 (IL-1RN).

Además, se describe un método para tratar a un individuo humano con un trastorno del cartílago, que comprende (a) someter a ensayo una muestra biológica de un individuo al que se le ha diagnosticado el trastorno del cartílago en cuanto al menos los siguientes dos loci 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 individuo si se detecta una de las siguientes condiciones: (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID nº: 6; y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de la 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 la SEQ ID nº: 7.

Como alternativa, el método para tratar a un individuo humano con un trastorno del cartílago comprende las etapas de: (a) someter a ensayo una muestra biológica de un individuo al que se le ha diagnosticado el trastorno del cartílago en cuanto al menos los siguientes dos loci 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 individuo si no se detecta SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID nº: 6 y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de la SEQ ID nº: 7.

En otra alternativa más, el método para seleccionar un individuo con un trastorno del cartílago, siendo dicho trastorno del cartílago susceptible de un tratamiento con un fármaco, comprende: (a) obtener una muestra biológica del individuo con un trastorno del cartílago con el fin de determinar si el trastorno del cartílago en el individuo es susceptible de un tratamiento con dicho fármaco; (b) poner la muestra biológica en contacto con al menos dos oligonucleótidos capaces de interrogar si la muestra biológica comprende la combinación de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) seleccionada entre (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID nº: 6, y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de la 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 la SEQ ID nº: 7, o no la comprende; (c) identificar el trastorno del cartílago en el individuo como susceptible de un tratamiento con dicho fármaco cuando se detecte cualquiera de las dos combinaciones de (i) o (ii) en la muestra biológica e identificar el trastorno del cartílago en el individuo como poco sensible o no sensible al tratamiento con dicho fármaco cuando no se detecte ni (i) ni (ii) en la muestra biológica.

En la presente memoria se describe también un método para seleccionar un régimen de tratamiento para un individuo con un trastorno del cartílago, que comprende: (a) obtener una muestra de ensayo del individuo humano al que se le ha diagnosticado depresión; (b) someter la muestra de ensayo a al menos un análisis para determinar parámetros de al menos dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), en donde los al menos dos SNP comprenden lo siguiente: (i) SNP1, y (ii) SNP2, (c) detectar, utilizando los SNP, la presencia de al menos una condición de las siguientes o una combinación de las mismas: i. SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID nº: 6; y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de la 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 la SEQ ID nº: 7; o iii. SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID nº: 6 y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de la SEQ ID nº: 7 (d) proporcionar un resultado que muestre si se detecta al menos una de dichas condiciones en la muestra de ensayo y, cuando se detecte la condición (i) o (ii), seleccionar y opcionalmente administrar un régimen de tratamiento que comprende un fármaco al individuo humano y, cuando se detecte la condición (iii), no seleccionar ni administrar un régimen de tratamiento que comprende dicho fármaco al individuo humano.

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), de los que se ha predicho que son supersensibles, se seleccionan preferiblemente para un régimen terapéutico alternativo en el que la dosis del fármaco que se ha de administrar está reducida, en comparación con el régimen terapéutico normal, es decir el régimen terapéutico para un paciente del que se ha predicho que es sensible al tratamiento con un fármaco, pero que no presenta riesgo de desarrollar acontecimientos RIA.

En otro aspecto de la descripción se proporcionan también sistemas (y medios legibles por ordenador para causar sistemas informáticos) para obtener datos. Dichos datos pueden utilizarse en particular para evaluar la idoneidad de un tratamiento con un fármaco en un individuo, para evaluar el riesgo de que el individuo desarrolle RIA cuando es tratado con dicho fármaco, o para realizar el seguimiento de la eficacia del tratamiento de un individuo con dicho fármaco. Dichos sistemas pueden utilizarse durante ensayos clínicos, en particular cuando haya de preverse un tratamiento con un fármaco para tratar un trastorno del cartílago o cuando ya esté en curso un tratamiento con dicho compuesto.

Por lo tanto, en un aspecto de la presente descripción está incluido un sistema informático para obtener datos a partir de al menos una muestra de ensayo obtenida de al menos un individuo con un trastorno del cartílago, comprendiendo el sistema: (a) al menos un módulo de determinación configurado para recibir dicha al menos una muestra de ensayo y llevar a cabo al menos un análisis en dicha al menos una muestra de ensayo para determinar la presencia o la ausencia de las condiciones siguientes: (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID nº: 6, y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de la 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 n°: 6; y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de la SEQ ID n°: 7; o (iii) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID n°: 6, y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de la SEQ ID n°: 7; (b) al menos un dispositivo de almacenamiento configurado para almacenar una salida de datos de dicho módulo de determinación; y (c) al menos un módulo de visualización para visualizar un contenido basado en parte en la salida de datos de dicho módulo de determinación, comprendiendo el contenido una señal que indica la presencia de al menos una de estas condiciones, y opcionalmente la ausencia de una cualquiera de estas condiciones.

También se describe un sistema informático para obtener datos a partir de al menos una muestra de ensayo obtenida de al menos un individuo, comprendiendo el sistema: (a) un módulo de determinación configurado para recibir dicha al menos una muestra de ensayo y llevar a cabo al menos un análisis de genotipado en dicha al menos una muestra de ensayo para determinar los genotipos de al menos dos loci, comprendiendo dichos al menos dos loci: (i) SNP1, y (ii) SNP2, (b) un dispositivo de almacenamiento configurado para almacenar 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 polimorfismos seleccionadas entre las siguientes: i. SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID n°: 6; y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de la SEQ ID n°: 7; o ii. SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T/ en el complemento de la SEQ ID n°: 6; y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de la SEQ ID n°: 7; o iii. SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID n°: 6 y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de la SEQ ID n°: 7; y (d) un módulo de visualización para visualizar un contenido basado en parte en la salida de datos de dicho módulo informático, comprendiendo el contenido una señal que indica la presencia de la combinación (i), (ii) o (iii) de los SNP, y opcionalmente la ausencia de una cualquiera o más de las combinaciones (i), (ii) y (iii) de los SNP.

El medio legible por ordenador puede tener registradas unas instrucciones legibles por ordenador para definir módulos de *software* para implementar un método en un 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, identificando la comparación la presencia o la ausencia de al menos una de las siguientes condiciones: (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID n°: 6, y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de la SEQ ID n°: 7, o (ii) SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T/ en el complemento de la SEQ ID n°: 6; y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de la SEQ ID n°: 7; o (iii) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID n°: 6, y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de la SEQ ID n°: 7; y (b) instrucciones para visualizar un contenido basado en parte en la salida de datos de dicho módulo de determinación, comprendiendo el contenido una señal que indica la presencia de al menos una de las condiciones, y opcionalmente la ausencia de una o más de las condiciones.

Los medios de almacenamiento legibles por ordenador pueden ser cualesquiera medios tangibles disponibles a los que pueda accederse mediante un ordenador. Los medios de almacenamiento legibles por ordenador incluyen medios tangibles volátiles y no volátiles, extraíbles y no extraíbles implementados en cualquier método o tecnología para almacenar información tal como instrucciones, estructuras de datos, subrutinas u otros datos legibles por ordenador. Los medios de almacenamiento legibles por ordenador incluyen, pero no se limitan a RAM (memoria de acceso aleatorio), ROM (memoria de sólo lectura), EPROM (memoria de sólo lectura programable borrable), EEPROM (memoria de sólo lectura programable y borrable eléctricamente), memoria rápida (*flash*) u otra tecnología de memoria, CD-ROM (disco compacto de memoria de sólo lectura), DVD (discos versátiles digitales) u otros medios ópticos de almacenamiento, casetes de cinta magnética, cinta magnética, almacenamiento en disco magnético u otros medios magnéticos de almacenamiento, otros tipos de memoria volátil y no volátil, y cualquier otro medio tangible que pueda utilizarse para almacenar la información deseada y al que pueda accederse mediante un ordenador, incluyendo cualquier combinación adecuada de los anteriores.

Los datos legibles por ordenador incorporados a uno o más medios legibles por ordenador pueden definir instrucciones, por ejemplo, como parte de uno o más programas que, como resultado de ser ejecutados por un ordenador, lleven al ordenador a realizar una o más de las funciones descritas en la presente memoria, y/o diversas realizaciones, variaciones y combinaciones de las mismas. Tales instrucciones pueden estar escritas en cualquiera de una pluralidad de lenguajes de programación, por ejemplo Java, J#, Visual Basic, C, C#, C++, Fortran, Pascal, Eiffel, Basic, lenguaje ensamblador COBOL y similares, o cualquiera de diversas combinaciones de los mismos. Los medios legibles por ordenador a los que están incorporadas tales instrucciones pueden residir en uno o más de los componentes bien de un sistema, bien de un medio de almacenamiento legible por ordenador, descrito en la presente memoria, y pueden estar distribuidos entre uno o más de tales componentes.

Los medios legibles por ordenador pueden ser transportables de manera que las instrucciones almacenadas en los mismos puedan cargarse en cualquier recurso informático para implementar los aspectos de la presente invención tratados en la presente memoria.

La información determinada en el módulo de determinación puede ser leída por el dispositivo de almacenamiento. El dispositivo de almacenamiento está adaptado o configurado para tener registrada información sobre el nivel de expresión o el nivel proteínico. Tal información puede proporcionarse en una forma digital que pueda transmitirse y

leerse electrónicamente, por ejemplo a través de Internet, en disquete, a través de USB (bus serial universal) o a través de cualquier otro modo de comunicación adecuado.

Debe entenderse que en el contexto de la presente descripción como un todo, por ejemplo en el contexto de uno cualquiera de los métodos, usos, ensayos o kits según la presente descripción, antes de determinar el genotipo en un locus es necesario obtener una muestra de ácido nucleico (o una muestra de ensayo) de un individuo, por ejemplo recogiendo sangre o saliva. Preferiblemente, la muestra de ácido nucleico es una muestra de ADN.

En el contexto de la presente descripción como un todo, por ejemplo en el contexto de uno cualquiera de los métodos, usos, sistema informático o kits según la presente invención, el fármaco preferido es un fármaco anabolizante, es decir que tiene un efecto anabolizante en el cartílago. En particular, dicho fármaco anabolizante está seleccionado del grupo que consiste en un compuesto de FGF-18, BMP-2, BMP-7, GDF-5, FGFβ, FGF-8, FGF-9, intensificadores de SOX-9, o TGFβ y cualesquiera variantes de los mismos. Más preferiblemente, el fármaco anabolizante es un compuesto de FGF-18 truncado, tal como sprifermin.

También en el contexto de la presente descripción como un todo, el trastorno del cartílago está seleccionado preferiblemente del grupo que consiste en osteoartritis, lesiones del cartílago, fracturas que afecten a cartílago articular o procedimientos quirúrgicos con repercusiones en cartílago articular (por ejemplo microfractura).

Un individuo que sufra de un trastorno del cartílago y que haya de ser sometido a pruebas y/o tratado según cualquiera de los métodos y usos descritos en la presente memoria es un individuo humano que es un candidato para un tratamiento con un fármaco, preferiblemente un fármaco anabolizante, tal como sprifermin. En una realización preferida, al individuo se le ha diagnosticado un trastorno del cartílago o presenta un síntoma de trastorno del cartílago. Dicho trastorno del cartílago está seleccionado preferiblemente del grupo que consiste en, pero no se limita a osteoartritis, lesiones del cartílago, fracturas que afecten a cartílago articular o procedimientos quirúrgicos con repercusiones en cartílago articular (por ejemplo microfractura).

Debe entenderse también que, en el contexto de la descripción como un todo, la determinación puede llevarse a cabo en la secuencia complementaria de IL1-RN rs9005 e IL1-RN rs315952. Se deduce por lo tanto que según la presente descripción como un todo, por ejemplo en el contexto de uno cualquiera de los métodos, usos, ensayos, sistema informático o kits según la presente descripción, 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 predictiva de una falta de respuesta o una respuesta pequeña (es decir no sensibilidad) a un tratamiento con un compuesto de FGF-18. Por el contrario, la presencia del genotipo T/C o T/T en la secuencia complementaria en IL-1RN rs9005 y A/G o G/G en la secuencia complementaria de IL-1RN rs315952 es predictiva de una gran respuesta (alta sensibilidad) a un tratamiento con un compuesto de FGF-18. Dicho genotipo será también un marcador de la probabilidad de que un paciente desarrolle acontecimientos RIA cuando es tratado con dicho compuesto de FGF-18. Los otros genotipos en estos loci son predictivos de una 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).

En la presente memoria se describe también un kit que comprende medios para llevar a cabo los métodos anteriormente descritos e instrucciones de uso. En particular, el kit comprende al menos un par de cebadores o sondas específicos para detectar la presencia o ausencia de los alelos. Preferiblemente, comprende dos pares de cebadores o sondas específicos para genotipar los alelos en los loci IL-1RN rs9005 e IL-1RN rs315952.

El kit puede comprender un conjunto ordenado de oligonucleótidos fijado con una pluralidad de sondas de oligonucleótido que interroge no más de 20 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), comprendiendo dichos SNP: (i) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID n°: 6, y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de la SEQ ID n°: 7; o (ii) SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T/ en el complemento de la SEQ ID n°: 6 y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de la SEQ ID n°: 7; o (iii) SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID n°: 6, y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de la SEQ ID n°: 7; un envase opcional que contenga un marcador detectable que se ha de conjugar con una molécula de nucleótido obtenida de una muestra de ensayo de un individuo al que se le ha diagnosticado un trastorno del cartílago; y al menos un reactivo.

Como alternativa, el conjunto ordenado de oligonucleótidos fijado con una pluralidad de sondas de oligonucleótido interroga no más de 17 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), no más de 10 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) o no más de 7 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).

En el contexto de esta descripción se describe también un kit que comprende: una pluralidad de cebadores o conjuntos de cebadores de oligonucleótido que se unen en cada caso para interrogar no más de un alelo específico de no más de 20 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), estando cada subconjunto de cebadores de oligonucleótido que se unen a un alelo específico de un SNP marcado con un informador (*reporter*) distinto y comprendiendo dichos SNP los siguientes SNP: i. SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID n°: 6, y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de la SEQ ID n°: 7; o ii. SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T/ en el complemento de la SEQ ID n°: 6 y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de la SEQ ID n°: 7; o iii.

SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID n°: 6, y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de la SEQ ID n°: 7; y al menos un reactivo.

- 5 Como alternativa, la pluralidad de cebadores o conjuntos de cebadores de oligonucleótido que se unen en cada caso para interrogar no más de un alelo específico de no más de 17 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), o no más de un alelo específico de no más de 10 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) o no más de un alelo específico de no más de 7 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).

- 10 También se describe un kit para seleccionar un régimen de tratamiento para un individuo con un trastorno del cartílago, que comprende al menos un reactivo para determinar, en una muestra de ensayo de un individuo humano al que se le ha diagnosticado el trastorno del cartílago, la presencia o ausencia de los siguientes SNP: i. SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID n°: 6, y SNP2 genotipo T/C o CC, o A/G o GG en el complemento de la SEQ ID n°: 7; o ii. SNP1 genotipo A/G o AA, o T/C o T/T/ en el complemento de la SEQ ID n°: 6 y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de la SEQ ID n°: 7; o iii. SNP1 genotipo G/G, o C/C en el complemento de la SEQ ID n°: 6 y SNP2 genotipo T/T, o A/A en el complemento de la SEQ ID n°: 7.

- 15 En algunos aspectos, los oligonucleótidos del kit son bien sondas específicas de alelo, bien cebadores específicos de alelo. En otras realizaciones, el kit comprende oligonucleótidos de extensión de cebador. En otros aspectos más, el conjunto de oligonucleótidos es una combinación de sondas específicas de alelo, cebadores específicos de alelo u oligonucleótidos de extensión de cebador.

- 20 La composición y la longitud de cada oligonucleótido en un kit de la invención dependerán de la naturaleza de la región genómica que contiene el marcador genético de la descripción, así como del tipo de ensayo que se haya de llevar a cabo con el oligonucleótido, y son fáciles de determinar por el experto. Por ejemplo, el polinucleótido que se ha de utilizar en el ensayo puede constituir un producto de multiplicación, y por lo tanto la especificidad requerida del oligonucleótido es con respecto a la hibridación con la región diana en el producto de multiplicación más que en ADN genómico aislado del individuo.

- 25 En aspectos preferidos, cada oligonucleótido del 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 al nucleótido situado en la posición correspondiente de la otra molécula. Aunque para detectar polimorfismos se prefieren oligonucleótidos perfectamente complementarios, se contemplan desviaciones de la complementariedad completa cuando tales desviaciones no impidan a la molécula hibridarse específicamente con la región diana como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, un cebador de oligonucleótido puede tener un fragmento no complementario en su extremo 5', siendo el resto del cebador completamente complementario a la región diana. Como alternativa, puede haber nucleótidos no complementarios intercalados en la sonda o el cebador, siempre que la sonda o el cebador resultante sea aún capaz de hibridarse específicamente con la región diana.

- 35 En algunos aspectos preferidos, cada oligonucleótido del kit se hibrida específicamente con su región diana en condiciones estrictas de hibridación. Las condiciones estrictas de hibridación dependen de la secuencia y varían en función de las circunstancias. Por lo general, las condiciones estrictas se seleccionan de modo que sean aproximadamente 5 °C menores que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica con una fuerza iónica y un pH definidos. La T_m es la temperatura (con una fuerza iónica, una concentración de ácidos nucleicos y un pH definidos) a la que el 50 % de las sondas complementarias a la secuencia diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Dado que las secuencias diana están por lo general presentes en exceso, a T_m el 50 % de las sondas están ocupadas en equilibrio. Típicamente, las condiciones estrictas incluyen una concentración de sal de al menos aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de ion Na (u otras sales) con un pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 25 °C para sondas de oligonucleótido cortas (por ejemplo 10 a 50 nucleótidos). Las condiciones estrictas pueden lograrse también con la adición de agentes de desestabilización tales como formamida. Por ejemplo, unas 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 son adecuadas para hibridaciones de sondas específicas de alelo.

- 50 Los oligonucleótidos de los kits de la descripción pueden comprender cualquier estado de fosforilación de ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y derivados de nucleótidos acíclicos y otros derivados funcionalmente equivalentes. Como alternativa, los oligonucleótidos pueden tener una cadena principal libre de fosfato, que puede comprender enlaces tales como carboximetilo, acetamidato, carbamato, poliamida [ácido nucleico peptídico (PNA)] y similares. Los oligonucleótidos pueden prepararse mediante síntesis química utilizando cualquier metodología adecuada conocida en la técnica, o pueden obtenerse de una muestra biológica, por ejemplo, mediante digestión por restricción. Los oligonucleótidos pueden contener un marcador detectable, según cualquier técnica conocida en el campo, incluyendo el uso de radiomarcadores, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, proteínas, haptenos, anticuerpos, marcas de secuencia y similares. Los oligonucleótidos del kit pueden producirse y comercializarse como reactivos específicos de analitos (ASR, por sus siglas en inglés) o pueden ser componentes constitutivos de un dispositivo de diagnóstico aprobado.

En otros aspectos preferidos, el kit incluye un manual de instrucciones que describe los diversos modos en que puede utilizarse el kit para detectar la presencia o ausencia de un marcador genético de la descripción.

En un aspecto preferido, el conjunto de oligonucleótidos del kit son oligonucleótidos específicos de alelo. Tal como se utiliza en la presente memoria, el concepto oligonucleótido específico de alelo (ASO, por sus siglas en inglés) significa un oligonucleótido que es capaz, en condiciones suficientemente estrictas, de hibridarse específicamente con un alelo de un marcador genético en una región diana que contenga el marcador genético, mientras que no se hibrida con la misma región si ésta contiene un alelo diferente. Como entenderá el experto, la especificidad con respecto al alelo dependerá de diversas condiciones de severidad fácilmente optimizadas, incluyendo concentraciones de sal y formamida, así como temperaturas para las etapas tanto de hibridación como de lavado.

Típicamente, un ASO será perfectamente complementario a un alelo conteniendo un mal apareamiento único para otro alelo. En sondas de ASO, el mal apareamiento único está preferiblemente dentro de una posición central de la sonda de oligonucleótido, dado que se alinea con el marcador genético en la región diana (por ejemplo aproximadamente la 7ª u 8ª posición en un 15mero, la 8ª o 9ª posición en un 16mero y la 10ª o 11ª posición en un 20mero). El mal apareamiento único en cebadores de ASO está situado en el nucleótido terminal 3', o preferiblemente en el penúltimo nucleótido 3'. La invención contempla sondas y cebadores de ASO que se hibriden bien a la cadena codificante, bien a la cadena no codificante.

En otros aspectos preferidos, el kit comprende una pareja de oligonucleótidos específicos de alelo para un marcador genético de la invención que se haya de someter a ensayo, siendo un miembro de la pareja específico para un alelo y siendo el otro miembro específico para otro alelo. En tales realizaciones, los oligonucleótidos de la pareja pueden tener diferentes longitudes o tener diferentes marcadores detectables para permitir al usuario del kit determinar qué oligonucleótido específico de alelo se ha hibridado específicamente a la región diana y determinar así qué alelo está presente en el individuo en el locus de marcador sometido a ensayo.

En otros aspectos preferidos más, los oligonucleótidos del kit son oligonucleótidos de extensión de cebador. Se eligen mezclas de terminación para una extensión mediada por polimerasa a partir de cualquiera de estos oligonucleótidos para terminar la extensión del oligonucleótido en el marcador genético de interés, o una base después, dependiendo de los nucleótidos alternativos presentes en el locus de marcador.

Los métodos y kits según la presente descripción son útiles en aplicaciones clínicas de diagnóstico. Sin embargo, tal como se utiliza en la presente memoria, el término "diagnóstico" no está limitado a usos clínicos o médicos, y los métodos y kits de diagnóstico de la invención reivindicados en la presente memoria resultan también útiles en cualquier aplicación de investigación y durante ensayos clínicos, para los que sea deseable someter a un individuo a ensayo en cuanto a la presencia o ausencia de cualquier marcador genético descrito en la presente memoria.

En el contexto de la descripción, la presencia o ausencia de un alelo concreto o de una pareja concreta de alelos en el locus de un marcador genético de la invención en un individuo puede detectarse mediante cualquier técnica en sí conocida por el experto, incluyendo secuenciación, pirosecuenciación, hibridación selectiva, multiplicación selectiva y/o espectrometría de masas incluyendo espectrometría de masas por tiempo de vuelo con desorción/ionización láser asistida por matriz (EM MALDI-TOF, por sus siglas en inglés). En una realización concreta, la alteración se detecta mediante multiplicación selectiva de ácidos nucleicos utilizando uno o varios cebadores específicos. La alteración se detecta mediante hibridación selectiva utilizando una o varias sondas específicas.

Otras técnicas incluyen métodos de genotipado basados en electroforesis en gel tales como PCR acoplada con análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), PCR multiplex, ensayo de ligación de oligonucleótidos y minisequenciación; tecnologías de genotipado basadas en colorante fluorescente tales como un marcador, en una región diana que contenga el marcador genético, mientras que no se hibrida con la misma región si ésta contiene un alelo diferente. Como entenderá el experto, la especificidad con respecto al alelo dependerá de diversas condiciones de severidad fácilmente optimizadas, incluyendo concentraciones de sal y formamida, así como temperaturas para las etapas tanto de hibridación como de lavado.

Típicamente, un ASO será perfectamente complementario a un alelo conteniendo un mal apareamiento único para otro alelo. En sondas de ASO, el mal apareamiento único está preferiblemente dentro de una posición central de la sonda de oligonucleótido, dado que se alinea con el marcador genético en la región diana (por ejemplo aproximadamente la 7ª u 8ª posición en un 15mero, la 8ª o 9ª posición en un 16mero y la 10ª o 11ª posición en un 20mero). El mal apareamiento único en cebadores de ASO está situado en el nucleótido terminal 3', o preferiblemente en el penúltimo nucleótido 3'. La invención contempla sondas y cebadores de ASO que se hibriden bien a la cadena codificante, bien a la cadena no codificante.

En otras realizaciones preferidas, el kit comprende una pareja de oligonucleótidos específicos de alelo para un marcador genético de la invención que se haya de someter a ensayo, siendo un miembro de la pareja específico para un alelo y siendo el otro miembro específico para otro alelo. En tales realizaciones, los oligonucleótidos de la pareja pueden tener diferentes longitudes o tener diferentes marcadores detectables para permitir al usuario del kit determinar qué oligonucleótido específico de alelo se ha hibridado específicamente a la región diana y determinar así qué alelo está presente en el individuo en el locus de marcador sometido a ensayo.

En otras realizaciones preferidas más, los oligonucleótidos del kit son oligonucleótidos de extensión de cebador. Se eligen mezclas de terminación para una extensión mediada por polimerasa a partir de cualquiera de estos

oligonucleótidos para terminar la extensión del oligonucleótido en el marcador genético de interés, o una base después, dependiendo de los nucleótidos alternativos presentes en el locus de marcador.

Los métodos y kits según la presente descripción son útiles en aplicaciones clínicas de diagnóstico. Sin embargo, tal como se utiliza en la presente memoria, el término “diagnóstico” no está limitado a usos clínicos o médicos, y los métodos y kits de diagnóstico de la invención reivindicados en la presente memoria resultan también útiles en cualquier aplicación de investigación y durante ensayos clínicos, para los que sea deseable someter a un individuo a ensayo en cuanto a la presencia o ausencia de cualquier marcador genético descrito en la presente memoria.

En el contexto de la invención, la presencia o ausencia de un alelo concreto o de una pareja concreta de alelos en el locus de un marcador genético de la invención en un individuo puede detectarse mediante cualquier técnica en sí conocida por el experto, incluyendo secuenciación, pirosecuenciación, hibridación selectiva, multiplicación selectiva y/o espectrometría de masas incluyendo espectrometría de masas por tiempo de vuelo con desorción/ionización láser asistida por matriz (EM MALDI-TOF, por sus siglas en inglés). En una realización concreta, la alteración se detecta mediante multiplicación selectiva de ácidos nucleicos utilizando uno o varios cebadores específicos. La alteración se detecta mediante hibridación selectiva utilizando una o varias sondas específicas.

Otras técnicas incluyen métodos de genotipado basados en electroforesis en gel tales como PCR acoplada con análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), PCR multiplex, ensayo de ligación de oligonucleótidos y minisequenciación; tecnologías de genotipado basadas en colorante fluorescente tales como ensayos de ligación de oligonucleótidos, pirosecuenciación, extensión de una sola base con detección de fluorescencia, hibridación en solución homogénea tal como TaqMan, y genotipado por balizas moleculares; tecnologías basadas en secuenciación tales como secuenciación de Sanger y plataformas de secuenciación de nueva generación; multiplicación por círculo rodante y ensayos Invader, así como micromatrices basadas en chips de ADN y tecnologías de genotipado por espectrometría de masas. En la técnica se conocen métodos de análisis de expresión proteínica que incluyen electroforesis en gel bidimensional, espectrometría de masas y micromatrices de anticuerpos. La secuenciación puede llevarse a cabo utilizando técnicas muy conocidas en el campo, por ejemplo utilizando secuenciadores automáticos. La secuenciación puede realizarse en el gen completo o, más preferiblemente, en dominios específicos del mismo, típicamente aquellos de los que se sepa o se sospeche que llevan mutaciones deletéreas u otras alteraciones.

La multiplicación puede realizarse según diversas técnicas conocidas en el campo, tales como mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), reacción en cadena de la ligasa (LCR, por sus siglas en inglés) y multiplicación con desplazamiento de cadena (SDA, por sus siglas en inglés). Estas técnicas pueden realizarse utilizando reactivos y protocolos comercialmente disponibles. Una técnica preferida es PCR específica de alelo.

Otras realizaciones de la invención dentro del alcance de las reivindicaciones de la presente memoria serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la especificación o la práctica de la invención como se describe en la presente memoria. Se tiene la intención de que la especificación, junto con los ejemplos, sea considerada sólo ejemplar, estando el alcance de la invención indicado por las reivindicaciones que siguen a los ejemplos.

Descripción de las Figuras:

Notas generales: en las figuras, 1) los términos TT, CC, GG o AA deben entenderse como T/T, C/C, G/G o A/A, y 2) el término CTA debe entenderse como C-T-A.

Figura 1: Organización del complejo de genes IL1R1-IL1A-IL1B-IL1RN. Tanto rs315952 como rs9005 están situados en el último exón de IL1RN. Aunque sólo hay 1.107 pb entre ellos, estos SNP no se heredan juntos (es decir no en desequilibrio de enlace). IL-1RN-rs9005 está dentro de la región 3' UTR y está solapado tanto a un factor de transcripción (secuencia ChIP-seq: FOSL2) como a un complejo de ADNasa (las regiones reguladoras y el promotor tienden a ser sensibles a la ADNasa). IL-1RN-rs315952 es un SNP silencioso codificante (es decir no lleva a un cambio de aminoácido).

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

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

Figura 4: Cambio en volumen total de cartílago (mm³) en la semana 52 estratificado por pauta posológica y estratificado por su genotipo tanto en rs315952 como en rs9005. Cada punto corresponde a un individuo, un círculo indica un individuo sin RIA, mientras que una cruz indica un individuo con RIA. Los datos de IRM de la cohorte

MAD010 mostraron una variabilidad anormal y no se incluyeron en ningún análisis.

Figura 5: Cambio en puntuación WOMAC total en la semana 52 estratificado por pauta posológica y estratificado por su genotipo tanto en rs315952 como en rs9005. Cada punto corresponde a un individuo, un círculo indica un individuo sin RIA, mientras que una cruz indica un individuo con RIA.

- 5 Figura 6: Estratificación de los pacientes en función de la presencia o ausencia del genotipo 'rs9005 G/G rs315952 T/T'. El eje Y muestra la puntuación WOMAC total absoluta en la base. Cada punto corresponde a un individuo, un círculo indica un individuo con un grado Kellgren-Lawrence igual a 2, mientras que una cruz indica un individuo con un grado Kellgren-Lawrence igual a 3. El valor p indicado se obtuvo a partir de un ensayo univariante no paramétrico (prueba de suma de rangos).
- 10 Figura 7: Estratificación de los pacientes en función de la presencia o ausencia del genotipo 'portadores de rs9005 A portadores de rs315952 C'. El eje Y muestra la puntuación WOMAC total absoluta en la base. Cada punto corresponde a un individuo, un círculo indica un individuo con un grado Kellgren-Lawrence igual a 2, mientras que una cruz indica un individuo con un grado Kellgren-Lawrence igual a 3. El valor p indicado se obtuvo a partir de un ensayo univariante no paramétrico (prueba de suma de rangos).
- 15 Figura 8: Estratificación de los pacientes en función de la presencia o ausencia del genotipo 'rs9005 G/G rs315952 T/T'. El eje Y muestra el volumen total absoluto (mm³) de cartílago en la base. Cada punto corresponde a un individuo, un círculo indica un individuo con un grado Kellgren-Lawrence igual a 2, mientras que una cruz indica un individuo con un grado Kellgren-Lawrence igual a 3. El valor p indicado se obtuvo a partir de un ensayo univariante no paramétrico (prueba de suma de rangos).
- 20 Figura 9: Estratificación de los pacientes en función de la presencia o ausencia del genotipo 'portadores de rs9005 A portadores de rs315952 C'. El eje Y muestra el volumen total absoluto (mm³) de cartílago en la base. Cada punto corresponde a un individuo, un círculo indica un individuo con un grado Kellgren-Lawrence igual a 2, mientras que una cruz indica un individuo con un grado Kellgren-Lawrence igual a 3. El valor p indicado se obtuvo a partir de un ensayo univariante no paramétrico (prueba de suma de rangos).
- 25 Figura 10: Cambio desde la base en puntuación WOMAC total para todos los individuos, sin tener en cuenta sus genotipos. Las líneas corresponden al cambio medio desde la base y las barras de error corresponden al error estándar de la media.
- 30 Figura 11: Cambio desde la base en puntuación WOMAC total para individuos identificados como sensibles o supersensibles sobre la base de sus genotipos rs9005 y rs315952. El grupo 'tratado' corresponde a individuos de la cohorte MAD100 que tienen el genotipo que identifica a los individuos sensibles. Los individuos de la cohorte MAD030 que tienen el genotipo que identifica a los individuos supersensibles también se incluyen en este grupo 'tratado'. El grupo 'placebo' incluye individuos placebo con genotipo correspondiente bien a los sensibles, bien a los supersensibles. Las líneas corresponden al cambio medio desde la base y las barras de error corresponden al error estándar de la media.
- 35 Figura 12: Cambio desde la base en puntuación WOMAC total para individuos que tienen el genotipo correspondiente a los no sensibles. Las líneas corresponden al cambio medio desde la base y las barras de error corresponden al error estándar de la media.
- 40 Figura 13: Cambio desde la base en volumen total de cartílago (mm³) para todos los individuos, sin tener en cuenta sus genotipos. Las líneas corresponden al cambio medio desde la base y las barras de error corresponden al error estándar de la media. Los datos de IRM de la cohorte MAD010 mostraron una variabilidad anormal y no se incluyeron en ningún análisis.
- 45 Figura 14: Cambio desde la base en volumen total de cartílago (mm³) para individuos identificados como sensibles o supersensibles sobre la base de sus genotipos rs9005 y rs315952. El grupo 'tratado' corresponde a individuos de la cohorte MAD100 que tienen el genotipo que identifica a los sensibles. Los individuos de la cohorte MAD030 que tienen el genotipo que identifica a los supersensibles también se incluyen en este grupo 'tratado'. El grupo 'placebo' incluye individuos placebo con genotipo correspondiente bien a los sensibles, bien a los supersensibles. Las líneas corresponden al cambio medio desde la base y las barras de error corresponden al error estándar de la media. Los datos de IRM de la cohorte MAD010 no pasaron el control de calidad y no se incluyeron en ningún análisis.
- 50 Figura 15: Cambio desde la base en volumen total de cartílago (mm³) para individuos que tienen el genotipo correspondiente a los no sensibles. Las líneas corresponden al cambio medio desde la base y las barras de error corresponden al error estándar de la media. Los datos de IRM de la cohorte MAD010 mostraron una variabilidad anormal y no se incluyeron en ningún análisis.

Figura 16(a)-(h): Presenta las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de longitud completa correspondientes a las "SEQ ID n°" citadas en la presente solicitud de patente.

Descripción de las secuencias:

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

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

SEQ ID nº 3: Gen IL1RN

5 SEQ ID nº 4: Locus rs9005 de IL1RN

SEQ ID nº 5: Locus rs315952 de IL1RN

SEQ ID nº 6: Región específica del locus rs9005 de IL1RN (correspondiente a los nucleótidos 415 a 466 de la SEQ ID nº 4), en donde N es A o G.

10 SEQ ID nº 7: Región específica del locus rs315952 de IL1RN (correspondiente a los nucleótidos 415 a 466 de la SEQ ID nº 5), en donde N es C o T

SEQ ID nº 8: Cebador 1 de rs315952

SEQ ID nº 9: Cebador 2 de rs315952

SEQ ID nº 10: Cebador 1 de rs9005

SEQ ID nº 11: Cebador 2 de rs9005

15 Ejemplos

1. Antecedentes de genotipado:

El nivel de crecimiento del volumen de cartílago y el riesgo asociado de acontecimientos adversos en respuesta a un tratamiento con un fármaco (tal como un tratamiento con sprifermin) en trastornos del cartílago, tales como la osteoartritis, lesiones del cartílago, fracturas que afecten a cartílago articular o procedimientos quirúrgicos con repercusiones en cartílago articular (por ejemplo microfractura), pueden estar asociados respectivamente con una variación genética específica en uno o varios genes. En el presente estudio, la búsqueda de asociaciones entre genes que contienen variaciones y el trastorno o la respuesta al tratamiento se centró en genes candidato que se seleccionaron sobre la base del papel fisiológico de las proteínas que codifican y su implicación potencial en los trastornos del cartílago, o en la respuesta al tratamiento con sprifermin. En la Tabla 1 figura la lista de los SNP candidato seleccionados que han sido sometidos a ensayo.

La respuesta al tratamiento con sprifermin se midió mediante el cambio en volumen de cartílago desde la base 1 año después del comienzo del tratamiento con sprifermin.

Hay que señalar que los marcadores de SNP candidato y de examen de genoma completo no se guardaban para un análisis posterior si se cumplía cualquiera de los criterios siguientes:

- 30 • Variante rara SNP en la población PGx ITT: Frecuencia de alelo secundario (MAF, por sus siglas en inglés) < 10 % tanto para los SNP candidato como para los SNP de examen de genoma completo.
- Calidad de genotipado cuestionable, medida por un alto porcentaje (≥ 5 %) de datos faltantes.
- Desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg (valor p ajustado por Bonferroni menos de 5 % para los SNP candidato o FDR (es decir valor p ajustado por Benjamini-Hochberg) menos de 20 % para los
- 35 SNP de examen de genoma completo).
- Se excluyen los individuos con discrepancia de sexo entre la base de datos clínica y el sexo predicho a partir de los datos de SNP de examen de genoma completo (cromosoma X).

Los genes candidato seleccionados han estado previamente implicados en trastornos del cartílago, tales como la osteoartritis. El propósito del estudio era investigar si el nivel de respuesta, es decir el crecimiento del volumen de cartílago y/o la existencia de acontecimientos adversos en respuesta a un tratamiento con sprifermin en el trastorno del cartílago, está correlacionado con una variante específica de ADN o un patrón específico de variantes. La existencia de tal correlación indicaría que bien el o los genes que llevan la o las variantes identificadas, bien uno o más genes situados en las inmediaciones de las variantes, pueden ser genes de pensión.

2 Materiales y métodos

45 2.1. Compuesto de FGF-18

El compuesto de FGF-18 utilizado como tratamiento en los presentes ejemplos es sprifermin. Es una forma truncada

de FGF-18, como se define en la sección “definiciones”.

2.2. Recepción de muestra y doble codificación

5 Se recibieron muestras de sangre de pacientes que participaron en el estudio 28980 (un estudio de dosis única y múltiple ascendente aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo, multicéntrico, de sprifermin, administrado por vía intraarticular en pacientes con osteoartritis primaria de la rodilla, de los que no se espera que vayan a requerir cirugía de rodilla en el plazo de un año)

10 Con el fin de cumplir el formulario de consentimiento informado (FCI) de farmacogenómica (PGx), que cubría los análisis de ADN, todas las muestras fueron dotadas de una doble codificación por el Biobank (Merck Serono, Ginebra) para asegurar un nivel adicional de anonimato de los individuos. El Biobank proporcionó el grupo de gestión de datos de biomarcador con la codificación de doble clave en forma de un archivo sencillo que contenía tanto la ID de PGx como la ID de individuo para cada individuo. Se realizaron verificaciones adicionales para asegurarse de que no se efectuaban análisis de ADN en individuos que no hubiesen dado su consentimiento al estudio de PGx.

2.3. Extracción, multiplicación, fragmentación y marcado de muestras de ADN

15 El análisis se realizó en ADN extraído de sangre. Se recibieron un total de 140 muestras de sangre. De estas 140, 3 muestras fueron destruidas por el laboratorio de genómica dado que los pacientes retiraron su consentimiento durante el curso del estudio; esto tuvo como resultado 137 ADN analizados correspondientes a 137 pacientes. Así pues, 137 pacientes fueron genotipados y cumplían los requisitos para los estudios de asociación.

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

25 Para cada placa, las muestras de ADN genómico se digirieron con endonucleasas de restricción Nsp I y Sty I, ligadas con adaptadores específicos (Nsp o Sty), procesadas en paralelo hasta las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR multiplicó por tres el producto de ligación para las reacciones Styl y por cuatro para las reacciones Nspl, para lograr una gran eficacia. Todos los productos de PCR fueron reunidos, purificados, cuantificados, fragmentados y marcados.

30 La etapa de multiplicación por PCR se evaluó utilizando gel de agarosa de electroforesis. La etapa de cuantificación de ADN se midió utilizando un espectrofotómetro y la etapa de fragmentación de ADN se evaluó utilizando gel de agarosa de electroforesis. El promedio del tamaño de los fragmentos de ADN debería ser menor de 180 pb.

2.4. Tecnología de micromatriz de ADN (examen de genoma completo)

35 Para realizar el examen de genoma completo (propuesta libre de hipótesis) se utilizaron los ensayos Affymetrix Genome Wide SNP 6.0. La tecnología Affymetrix está basada en un chip de ADN que permite genotipar aproximadamente 906.600 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) por paciente. Los SNP están distribuidos aleatoriamente en todos los cromosomas y se utilizan como marcadores de marcación del área genómica correspondiente. Los detalles del proceso y el protocolo siguieron la tecnología PGX Affymetrix wide-genome SNP 5.0/6.0.

Para cada muestra, el producto marcado se hibridó en el Affymetrix Genome Wide SNP 6.0 GeneChip. Se utilizaron dos lotes de chips para ambos conjuntos.

40 Tras la hibridación y la coloración, se barrieron los Affymetrix Gene Chips para crear archivos de datos de imagen (DAT). Después, el *software* AGCC alineó automáticamente una malla en los archivos DAT y calculó el archivo de datos de intensidad celular (CEL). Luego, los datos CEL pasaron al *software* Genotyping Console, que generó datos de análisis de muestras (CHP).

45 Se realizó un control de calidad de análisis utilizando el *software* Genotyping Console, que evaluó el análisis de porcentaje de llamada de QC (control de calidad) de modelo dinámico (MD) de un subconjunto de 3.022 SNP después del barrido del chip. Los porcentajes de llamada del MD miden la consistencia de intensidades dentro de cada SNP, con cuatro posibles estados de genotipado (nulo, AA, AB y BB). Proporcionan una estimación de la calidad global para una muestra de datos antes de realizar un análisis de conglomerados completo. Está basado en la proporción de llamada de control de calidad.

50 La proporción de llamada de control de calidad (QC CR, por sus siglas en inglés) está bien correlacionada con el rendimiento de conglomeración y es una métrica de muestra única eficaz para decidir qué muestras deberían utilizarse en la conglomeración aguas abajo. El umbral fijado para los ensayos Genome wide SNP6.0 es $\geq 86\%$. Además de la QC CR, se ha desarrollado otro algoritmo para ensayos SNP 6.0. Este nuevo algoritmo es el QC de contraste. El QC de contraste es una métrica que capta la capacidad de un experimento para resolver señales SNP

en tres complejos de genotipos. Mide la separación de intensidades de alelos en tres complejos en “espacio de contraste”. El espacio de contraste es una proyección del espacio de intensidad de alelos bidimensional en una única dimensión informativa. El umbral por defecto es $\geq 0,4$ para cada muestra. Los resultados del QC se visualizan automáticamente en la tabla de QC de intensidad. Las muestras que pasan el umbral de QC (porcentaje de llamada $> 86\%$ y QC de contraste $> 0,4$) se anotan como “incluidas” y las que no pasan el QC (porcentaje de llamada $< 86\%$ o QC de contraste $< 0,4$) se anotan como “excluidas”. Las muestras de ADN genómico del estudio pasaron todas el QC.

Se realizaron barridos del genoma completo para identificar los SNP asociados de forma marginal con reacciones inflamatorias agudas (RIA); cambio en volumen de cartilago y cambio en puntuaciones WOMAC totales. En la Tabla 1 puede verse la lista de SNP con asociación marginal (valor p empírico $< 5\%$ después de $n=1.000$ permutaciones). Ningún SNP estaba asociado de forma marginal con un cambio en el volumen total de cartilago.

2.5. Genotipado de SNP TaqMan (gen candidato)

Se realizó un genotipado de SNP TaqMan para detectar marcadores seleccionados sobre la base de información bibliográfica. Se seleccionaron y se llevaron a cabo en dos periodos (véanse las Tablas 2a y 2b) un total de 19 SNP distribuidos entre 8 genes candidato. En un ensayo de genotipado de SNP TaqMan® se utilizan dos cebadores de PCR específicos de locus que rodean los SNP para multiplicar un fragmento de aproximadamente 100 pb (véase por ejemplo la Tabla 3). Después se hibridan dos sondas específicas de alelo con su secuencia de SNP específica. Cada sonda se marcó en su extremo 5' bien con un colorante informador fluorescente (FAM), bien con el colorante informador VIC. Cada sonda tiene también un colorante no fluorescente inhibidor de la fluorescencia, MGB, en el extremo 3'. En cada ciclo de PCR, si se multiplica la secuencia diana de la sonda específica de alelo, la sonda se hibridará con el ADN durante la etapa de reasociación y se extenderá. Cuando la ADN polimerasa entra en contacto con su sonda hibridada, el colorante informador de la sonda se escinde de la sonda dejando atrás el colorante inhibidor de la fluorescencia. En cada ciclo de la PCR, la escisión de los colorantes informadores de una o de ambas sondas específicas de alelo causa un aumento exponencial en la intensidad de fluorescencia. Al completarse la PCR, se lee la fluorescencia total de cada muestra en el ABI 9700 (formato de 384 pocillos). Si se observa fluorescencia procedente de sólo una sonda, la muestra es homocigótica para este alelo. Si se observa fluorescencia para ambas sondas específicas de alelo, la muestra es heterocigótica para ambos alelos. Si la sonda no se hibrida, la fluorescencia del colorante está “inhibida” o reducida por el colorante inhibidor de la fluorescencia, y por lo tanto se observa una fluorescencia mínima, lo que indica un genotipo fallido.

El protocolo está detallado en la hoja de datos del genotipado de SNP TaqMan®.

Periodo 1: Las muestras de ADN se genotiparon con 17 ensayos de SNP TaqMan® (véase la Tabla 2a).

Periodo 2: Las muestras de ADN se genotiparon con 2 ensayos de SNP TaqMan® adicionales (véase la tabla 2b).

Para cada ensayo de SNP TaqMan®, el complejo NTC era específico y todos los NTC eran indeterminados, los tres complejos de muestras distintos estaban presentes y el genotipado se asignó automáticamente y el porcentaje de llamada especificado era superior a un 85 por ciento.

Para cada uno de los 19 ensayos de SNP TaqMan® en las tres partes se alcanzaron los criterios de aceptación.

2.6. Filtrado de SNP

Los marcadores de SNP candidato y de examen de genoma completo no se guardaban para análisis si se cumplía cualquiera de los criterios siguientes:

- Variante rara SNP en la población PGx ITT: Frecuencia de alelo secundario (MAF) $< 10\%$ tanto para los SNP candidato como para los SNP de examen de genoma completo.
- Calidad de genotipado cuestionable, medida por un alto porcentaje ($\geq 5\%$) de datos faltantes.
- Desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg (valor p ajustado por Bonferroni menos de 5% para los SNP candidato o FDR (es decir valor p ajustado por Benjamini-Hochberg) menos de 20% para los SNP de examen de genoma completo).
- Se excluyen los individuos con discrepancia de sexo entre la base de datos clínica y el sexo predicho a partir de los datos de SNP de examen de genoma completo (cromosoma X).

2.7. Ensayos de asociación

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

2.7.1. Asociación con reacciones inflamatorias agudas (RIA)

En estos análisis sólo se utilizaron individuos tratados con una dosis de FGF18 de 100 mcg. Para los análisis de un solo marcador se utilizaron dos estrategias: prueba exacta de Fisher y modelo lineal multivariante (es decir estado RIA ~ SNP + grado Kellgren Lawrence [2; 3] + sexo [hembra; varón] + edad [< 65; ≥ 65] + IMC [<30; ≥ 30]. En este modelo, la significación de cada término en el modelo se evaluó con un anova tipo III.

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

La asociación entre el cambio desde la base en la semana 52 (fecha de terminación), tanto para las puntuaciones WOMAC totales como para el volumen total de cartílago, se evaluó utilizando el siguiente modelo lineal:

Clasificación(cambio en punto final) ~ sección [placebos, individuos tratados por ejemplo con una dosis de 100 mcg de FGF-18] + grupo de genotipo + grado Kellgren Lawrence [2; 3] + sexo [hembra; varón] + edad [< 65; ≥ 65] + IMC [<30; ≥ 30].

La significación de cada término en el modelo se evaluó con un anova tipo III y el umbral de significación se estableció en alfa=5 %.

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

Para comprobar si un determinado grupo de genotipo (para por ejemplo individuos con el genotipo 'IL-1RN rs9005 G/G e IL-1RN rs315259 T/T') tenía un enriquecimiento significativo o una escasez significativa en individuos con osteoartritis grave (es decir grado 3 de Kellgren-Lawrence), se realizaron ensayos de independencia utilizando una prueba exacta de Fisher y a partir de la siguiente tabla de contingencia:

	Grado 3	Grado 2
número de individuos de un determinado grupo de genotipo		
número de individuos de los grupos de genotipo restantes		

En este análisis se incluyeron todos los individuos disponibles de cualquier pauta posológica (incluyendo los placebos). Los valores p se calcularon utilizando un ensayo bilateral y la significación se estableció en alfa = 5 %. También se calcularon la razón de posibilidades y sus intervalos de confianza del 95 %.

2.8. Análisis de haplotipo

Se pusieron en fase los datos de genotipo de los SNP rs419598, rs315952, rs9005 (utilizando el *software* MACH, versión 1.0.18.c, Li Y et al., 2010) para inferir la presencia o ausencia del haplotipo C-T-A en los individuos. Se utilizaron los siguientes parámetros MACH: "--tandas 50 --estados 200 --fase". La asociación con RIA se ensayó utilizando una prueba exacta de Fisher (umbral de significación establecido en alfa=5 %).

2.9. Análisis combinatorios entre los SNP candidato

En los análisis de asociación iniciales (datos no mostrados), se descubrió que el SNP rs9005 está asociado de forma significativa con las RIA. Se realizaron análisis combinatorios (es decir epistasis) para comprobar si IL-1RN rs9005 en combinación con otro SNP, de una lista de aproximadamente 120 SNP candidato, sería un mejor predictor de RIA (véase la Tabla 1). Tal análisis se llevó a cabo utilizando una regresión logística con el modelo siguiente:

Estado RIA ~ rs9005 * otro SNP + grado Kellgren Lawrence [2; 3] + sexo [hembra; varón] + edad [< 65; ≥ 65] + IMC [<30; ≥30].

La significación de cada término en el modelo se evaluó con un anova tipo III. Los valores p de interacción se ajustaron para un ensayo múltiple utilizando el procedimiento de Benjamini-Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995, J. of the Royal Statistical Society Series B(57):289) y el umbral de significación se estableció en FDR=5 %. Los efectos de epistasis se confirmaron utilizando la estrategia estadística descrita en (Wirapati et al., 2011).

2.10. Métrica de rendimiento en la predicción de RIA

La métrica de rendimiento en la predicción de RIA se obtuvo de la tabla de contingencia correspondiente. Esta métrica incluía sensibilidad, especificidad, exactitud, precisión, valor predictivo negativo y puntuación F1 (es decir media armónica de precisión y recuerdo).

3. Resultados

3.1. Análisis predictivos

Los análisis combinatorios identificaron sólo una combinación (IL-1RN rs9005 e IL-1RN rs315259) como asociada de forma significativa con RIA (FDR de modelo lineal multivariante = 0,0187, prueba exacta de Fisher valor $p = 0,0018$, razón de posibilidades = 18,82 [2,25-260,03]). En la Tabla 5 y la Tabla 6 se muestran respectivamente la tabla de contingencia y la métrica de rendimiento de predicción. La combinación de rs9005 y rs315259 (Tabla 6) tiene un mejor rendimiento a la hora de predecir RIA, en comparación con el haplotipo C-T-A (Tabla 8, véase también la tabla de contingencia en la Tabla 7). La combinación de IL-1RN rs9005 e IL-1RN rs315259 tiene una especificidad (94,44 %) y un valor predictivo negativo (89,47 %) muy grandes, es decir que estos biomarcadores tienen un rendimiento muy grande a la hora de identificar individuos que no tendrán RIA. Además, esta combinación pone de manifiesto una estratificación en el volumen total de cartílago (Figura 4) y las puntuaciones WOMAC totales (Figura 5). En cambio, el haplotipo C-T-A no permite tal estratificación del resultado clínico (Figuras 2 y 3). De hecho, el haplotipo C-T-A no permitió estratificar individuos en cuanto al cambio en volumen total de cartílago (Figura 2) ni el cambio en la puntuación WOMAC total (Figura 3). Así pues, el haplotipo C-T-A no fue identificado como un buen predictor de la respuesta a la terapia con un fármaco, preferiblemente un fármaco anabolizante tal como sprifermin.

3.2. Análisis de pronóstico

Los individuos placebo con el genotipo 'IL-1RN rs9005 G/G e IL-1RN rs315259 T/T' fueron identificados como poseedores de un volumen total de cartílago significativamente mayor que los individuos tratados con el mismo grupo de genotipo. Para hacer un seguimiento de este resultado, se modelaron en individuos placebo el cambio en la puntuación WOMAC total y el cambio en el volumen total de cartílago con la fórmula siguiente:

Clasificación(cambio en punto final) ~ grupo de genotipo + grado Kellgren Lawrence [2; 3] + sexo [hembra; varón] + edad [< 65 ; ≥ 65] + IMC [< 30 ; ≥ 30].

Entre los individuos de los cuatro grupos de genotipo diferentes no se halló ninguna diferencia significativa en la puntuación WOMAC total (valor $p = 0,63$, Tabla 10). Sin embargo, se hallaron diferencias significativas en el cambio en volumen total de cartílago (valor $p = 0,02$, Tabla 9). Los individuos del grupo de genotipo 'IL-1RN rs9005 G/G e IL-1RN rs315259 T/T' tienen un aumento del volumen total de cartílago significativamente mayor que los individuos de los grupos de genotipo restantes.

Un ensayo de independencia entre el grado Kellgren-Lawrence y los individuos de un determinado grupo de genotipo demostró que el grupo de genotipo 'IL-1RN rs9005 G/G e IL-1RN rs315259 T/T' tiene una escasez significativa en individuos del grado 3 de Kellgren-Lawrence (prueba exacta de Fisher valor $p = 0,0179$, Tabla 11). La razón de posibilidades correspondiente es 0,306 (con intervalos de confianza del 95 % [0,096, 0,885]). Esto demuestra que los individuos del grupo de genotipo 'IL-1RN rs9005 G/G e IL-1RN rs315259 T/T' están clasificados con un estado de osteoartritis menos grave que los individuos de otros grupos de genotipo. Respaldando este resultado, los individuos del grupo de genotipo 'IL-1RN rs9005 G/G e IL-1RN rs315259 T/T' tienen puntuaciones WOMAC totales de base ligeramente menores que los individuos de otros grupos de genotipo (suma de rangos valor $p = 0,0927$, véase la Figura 6). Además, los individuos del grupo de genotipo 'IL-1RN rs9005 GG e IL-1RN rs315259 TT' tienen un volumen total de cartílago de base significativamente mayor que los individuos de otros grupos de genotipo (suma de rangos valor $p = 0,0204$, véase la Figura 8).

Curiosamente, no había diferencia en la proporción de individuos con un grado 3 de Kellgren-Lawrence entre el grupo de genotipo 'portadores de IL-1RN rs9005 A y portadores de IL-1RN rs315259 C' (también denominados supersensibles) y los individuos de los grupos de genotipo restantes (prueba exacta de Fisher valor $p = 0,2736$, razón de posibilidades=1,693 [0,637, 4,769], Tabla 12). Así pues, el grupo supersensible no está enriquecido en individuos con un estado de osteoartritis grave. Esto se ve reforzado además por el hecho de que tanto las puntuaciones WOMAC totales de base como el volumen total de cartílago de base son comparables entre los individuos supersensibles y otros individuos (véanse las Figuras 7 y 9).

Los análisis con el haplotipo C-T-A no revelaron ninguna diferencia en la proporción de individuos con grado 3 de Kellgren-Lawrence y que llevaban al menos una copia del haplotipo C-T-A (prueba exacta de Fisher valor $p = 1$).

3.3. Resultados clínicos utilizando la prueba de diagnóstico genético propuesta

Sin ninguna estratificación genética, los resultados clínicos de la terapia con FGF-18 son los siguientes: 1) aumento significativo en el volumen total de cartílago en individuos tratados (MAD100) en comparación con placebos (valor $p = 0,0157$); 2) mejora ligeramente menor en puntuaciones WOMAC totales en individuos tratados (MAD100) en comparación con placebos (valor $p = 0,1044$); 3) 20 % de RIA en individuos tratados. Estos resultados están resumidos en la Tabla 13 y los resultados detallados se muestran en la Tabla 14 y la Tabla 15. Las Figuras 10 y 13 se proporcionan también para una visualización de datos. Se entiende que las figuras 10 a 15 no corresponden al modelo lineal multivariante utilizado para los análisis. Estas figuras se proporcionan sólo para facilitar la interpretación de los resultados.

La prueba de diagnóstico propuesta (Tabla 4) está destinada a:

1. Identificar sensibles y tratarlos con la dosis de FGF18 propuesta (por ejemplo 100 mcg)
2. Identificar supersensibles y tratarlos con una dosis de FGF18 menor (por ejemplo 30 mcg)
3. Identificar no sensibles y excluirlos de la terapia con FGF18.

5 Retrospectivamente, los resultados clínicos, para individuos elegidos para la terapia con FGF18, son

1. Aumento significativo en el volumen total de cartílago en individuos tratados (sensibles de la cohorte MAD100 + supersensibles de la cohorte MAD030) en comparación con placebos apareados (valor $p = 0,0016$ Tabla 18, Figura 14). Los estudios de simulación (*bootstrap*) demostraron que esta mejora en el volumen de cartílago es significativamente mayor que la mejora obtenida cuando no se utiliza una prueba de diagnóstico (valor $p < 1E-4$).
2. Mejora comparable en puntuaciones WOMAC totales entre individuos tratados y placebos (valor $p = 0,6603$, Tabla 17, Figura 11)
3. 11,43 % de RIA en individuos tratados (Tabla 16)

En cambio, los individuos identificados como no sensibles tienen los siguientes resultados clínicos:

1. Mejora significativamente menor en el volumen total de cartílago en individuos tratados (no sensibles de la cohorte MAD100) en comparación con placebos apareados (valor $p = 0,0289$, Tabla 21). Los individuos de la cohorte MAD030 tenían resultados similares a los de los individuos de la cohorte MAD100 (Figura 15). Así pues, ninguna de las dosis investigadas mostró una mejora con respecto a los placebos.
2. Aunque el valor p del modelo lineal multivariante no es significativo (valor $p = 0,3068$, Tabla 20), no hay mejora en la puntuación WOMAC total para los individuos tratados (mediana del cambio = -1), mientras que hay algo de mejora para los placebos (mediana del cambio = -39). Los individuos de las cohortes MAD010 y MAD030 tenían resultados similares a los de los individuos de la cohorte MAD100 (Figura 12). Así pues, ninguna de las dosis investigadas mostró una mejora con respecto a los placebos.
3. 22,22 % de RIA en individuos tratados (Tabla 19)

Se cuenta con lograr resultados similares con otros fármacos anabolizantes tales como BMP-2, BMP-7, GDF-5, FGF β , FGF-8, FGF-9, intensificadores de SOX-9, TGF β y cualesquiera variantes de los mismos.

Tablas

30 Tabla 1: Lista de los SNP candidato

Gen / descripción	SNP sometidos a ensayo
FGF18	rs3806929, rs4073716, rs9313543, rs4076077, rs4073717, rs6555956, rs10065728, rs4620037, rs11553493
FGFR1	rs2288696, 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
IL10	rs1878672, rs3024493, rs1554286, rs3024491, rs3024490

Gen / descripción	SNP sometidos a ensayo
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 marginal con RIA (del examen de genoma completo)	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 marginal con puntuación WOMAC total (del examen de genoma completo)	rs12410403, rs587505, rs9902708, rs734397, rs894013, rs932241
TNFRS1B	rs1061622
región VDR	rs731236, rs7975232, rs1544410

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

Símbolo de gen	Id rs	Id ensayo	Alelos NCBI	Tipo de ensayo
FGF18	rs4073716	C__27537611_10	C/T	Ensayado funcionalmente
FGF18	rs11553493	NA	G/T	A medida
FGF18,NPM1	rs3806929	C__11274941_10	C/T	Ensayado funcionalmente
FGFR2	rs755793	C__2414603_10	C/T	Validado
FGFR3	rs17881656	NA	C/T	A medida
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	Sistema a medida/SNPlex
IL6,LOC541472	rs1800796	C__11326893_10	C/G	Ensayado funcionalmente
LETM1,FGFR3	rs17884368	C__58182646_10	A/G	Ensayado funcionalmente

Símbolo de gen	Id rs	Id ensayo	Alelos NCBI	Tipo de ensayo
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

Tabla 2b: Detalles de Id de SNP TaqMan rastreados en periodo 2

Símbolo de gen	Id rs	Id ensayo	Alelos NCBI	Tipo de ensayo
IL1RN	rs9005	C_3133528_10	A/G	Ensayado funcionalmente
IL1RN	rs315952	C_11512470_10	C/T	Validado

Tabla 3: Secuencias de cebador Taqman

SNP referencia	ID ensayo Applied Biosystems	Secuencias de cebador
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

5

Tabla 4: Categorías de genotipo identificadas en la cohorte de dosis múltiple ascendente (100 mcg)

		rs9005 (A/G)	
		GG	Portadores A
rs315952 (T/C)	TT	grupo A:	Grupo B:
		no sensibles (20 % de MAD100)	Sensibles (27 % de MAD100)
	Portadores	grupo C:	grupo D:

		rs9005 (A/G)	
		GG	Portadores A
	C	sensibles (38 % de MAD100)	supersensibles (15 % de MAD100)

Tabla 5: Tabla de contingencia: predicciones de RIA basadas en genotipos rs9005 y rs315952 con individuos de la sección FGF18 MAD100 (n=45)

		Estado RIA real	
		Individuos con RIA	Individuos sin RIA
Estado predicho	Predicho con RIA	5	2
	Predicho sin RIA	4	34

- 5 Tabla 6: Rendimiento en predicción de RIA sobre la base de genotipos rs9005 y rs315952 con individuos de la sección FGF18 MAD100 (n=45)

Métrica de 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 RIA basadas en presencia/ausencia del haplotipo C-T-A con individuos de la sección FGF18 MAD100 (n=48)

		Estado RIA real	
		Individuos con RIA	Individuos sin RIA
Estado predicho	Predicho con RIA	6	7
	Predicho sin RIA	4	31

Tabla 8: Rendimiento en predicción de RIA sobre la base de presencia/ausencia del haplotipo C-T-A con individuos de la sección FGF18 MAD100 (n=48)

Métrica de rendimiento	valor
Sensibilidad	60 %
Exactitud	77,08 %
Especificidad	81,58 %
Precisión	46,15 %
Valor predictivo negativo	88,57 %
Sensibilidad y precisión (puntuación F1)	52,17 %

Tabla 9: Modelado lineal multivariante para cambio en volumen total de cartilago sólo con individuos placebo

término de modelo	coeficiente de regresión	error estándar	puntuación Z	valor p
Interceptación	78,44	23,68	3,31	0,0035
grupo [B-C-D; A sólo]	83,11	33,85	2,46	0,0234
Grado 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 [hembra; varón]	-15,01	20,31	-0,74	0,4683

5

Tabla 10: Modelado lineal multivariante para cambio en puntuación WOMAC total sólo con individuos placebo

término de modelo	coeficiente de regresión	error estándar	puntuación Z	valor p
Interceptación	63,76	20,40	3,13	0,0051
grupo [B-C-D; A sólo]	-13,98	28,71	-0,49	0,6313
Grado 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 [hembra; varón]	29,74	17,01	1,75	0,0950

Tabla 11: Tabla de contingencia: grado Kellgren-Lawrence (3 o 2) basado en presencia/ausencia del genotipo 'rs9005 GG rs315952 TT' - El análisis se realizó utilizando todos los individuos de todas las pautas posológicas (incluyendo placebos). El valor p de la prueba exacta de Fisher es 0,0179, la razón de posibilidades es 0,306 con un intervalo de confianza del 95 % [0,096, 0,885].

genotipo	Grado 3	Grado 2
rs9005 GG rs315952 TT	7	15
otros	60	39

5

Tabla 12: Tabla de contingencia: grado Kellgren-Lawrence (3 o 2) basado en presencia/ausencia del genotipo 'portadores rs9005 A portadores rs315952 C' - El análisis se realizó utilizando todos los individuos de todas las pautas posológicas (incluyendo placebos). El valor p de la prueba exacta de Fisher es 0,2736, la razón de posibilidades es 1,693 con un intervalo de confianza del 95 % [0,637, 4,769].

genotipo	Grado 3	Grado 2
portadores rs9005 A portadores rs315952 C	17	9
otros	50	45

10

Tabla 13: Resultados clínicos sin prueba de diagnóstico (45 individuos tratados con FGF18 100 mcg y 27 placebos) - Delta corresponde a la diferencia entre la mediana del cambio en placebos y la mediana del cambio en individuos tratados. El valor p corresponde al valor p de un ajuste de modelo lineal multivariante para sexo, edad, IMC y grado KL.

Grupos A, B, C, D	mediana del cambio en placebos	mediana del cambio en individuos tratados (MAD100)	delta	valor p
Cambio en puntuación WOMAC total	-19	-10	9	0,1044
Cambio en volumen total de cartilago	-44,68	102,25	146,93	0,0157
% RIA	3,7	20	16,3	NA

15

Tabla 14: Modelado lineal multivariante para cambio en puntuación WOMAC total con todos los placebos y todos los individuos tratados con MAD100

término de modelo	coeficiente de regresión	error estándar	puntuación Z	valor p (GLM)	LR ji cuadrado (anova)	valor p (anova)
Interceptación	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 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

término de modelo	coeficiente de regresión	error estándar	puntuación Z	valor p (GLM)	LR ji cuadrado (anova)	valor p (anova)
Sexo [hembra; varón]	20,13	11,84	1,70	0,0937	2,89	0,0890
Grado Kellgren-Lawrence [2;3]	0,14	11,79	0,01	0,9902	0,00	0,9902

Tabla 15: Modelado lineal multivariante para cambio en volumen total de cartilago con todos los placebos y todos los individuos tratados con MAD100

término de modelo	coeficiente de regresión	error estándar	puntuación Z	valor p (GLM)	LR ji cuadrado (anova)	valor p (anova)
Interceptación	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 [hembra; varón]	1,05	10,65	0,10	0,9216	0,01	0,9213
Grado Kellgren-Lawrence [2;3]	-1,25	10,61	-0,12	0,9065	0,01	0,9061

- 5 Tabla 16: Resultados clínicos para individuos clasificados como 1) sensibles (grupos B y C, n=29, tratados con FGF18 100 mcg) o 2) supersensibles (grupo D, n=6, tratados con una dosis menor de FGF18: 30 mcg). En el análisis se incluyeron 24 placebos, con genotipos del grupo B, C o D - Delta corresponde a la diferencia entre la mediana del cambio en placebos y la mediana del cambio en individuos tratados. El valor p corresponde al valor p de un ajuste de modelo lineal multivariante para sexo, edad, IMC y grado KL.

Grupos B, C, D	mediana del cambio en placebos	mediana del cambio en individuos tratados (MAD100+MAD30)	delta	valor p
Cambio en puntuación WOMAC total	-16,5	-13	3,5	0,6603
Cambio en volumen total de cartilago	-114,91	102,25	217,16	0,0016
% RIA	0	11,43	11,43	NA

10

Tabla 17: Modelado lineal multivariante para cambio en puntuación WOMAC total con individuos clasificados como 1) sensibles (grupos B y C, n=29, tratados con FGF18 100 mcg) o 2) supersensibles (grupo D, n=6, tratados con una dosis menor de FGF18: 30 mcg). En el análisis se incluyeron 24 placebos, con genotipos del grupo B, C o D.

término de modelo	coeficiente de regresión	error estándar	puntuación Z	valor p (GLM)	LR ji cuadrado (anova)	valor p (anova)
Interceptación	67,09	16,25	4,13	0,0001	NA	NA

término de modelo	coeficiente de regresión	error estándar	puntuación Z	valor p (GLM)	LR ji cuadrado (anova)	valor p (anova)
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 [hembra; varón]	16,54	13,68	1,21	0,2322	1,46	0,2268
Grado Kellgren-Lawrence [2;3]	6,67	13,09	0,51	0,6124	0,26	0,6103

Tabla 18: Modelado lineal multivariante para cambio en volumen total de cartilago con individuos clasificados como 1) sensibles (grupos B y C, n=29, tratados con FGF18 100 mcg) o 2) supersensibles (grupo D, n=6, tratados con una dosis menor de FGF18: 30 mcg). En el análisis se incluyeron 24 placebos, con genotipos del grupo B, C o D.

término de modelo	coeficiente de regresión	error estándar	puntuación Z	valor p (GLM)	LR ji cuadrado (anova)	valor p (anova)
Interceptación	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; tratados]	37,14	11,78	3,15	0,0027	9,94	0,0016
IMC [<30; >= 30]	-5,47	11,40	-0,48	0,6332	0,23	0,6312
Sexo [hembra; varón]	1,14	12,18	0,09	0,9258	0,01	0,9254
Grado Kellgren-Lawrence [2;3]	1,27	11,65	0,11	0,9137	0,01	0,9133

5

Tabla 19: Resultados clínicos para individuos clasificados como no sensibles mediante la prueba de diagnóstico (MAD100 n=9, MADPL n=3) - Delta corresponde a la diferencia entre la mediana del cambio en placebos y la mediana del cambio en individuos tratados. El valor p corresponde al valor p de un ajuste de modelo lineal multivariante para sexo, edad, IMC y grado KL.

Grupo A sólo	mediana del cambio en placebos	mediana del cambio en individuos tratados (MAD100)	delta	valor p
Cambio en puntuación WOMAC total	-39	-1	38	0,3068
Cambio en volumen total de cartilago	224,56	117,92	-106,64	0,0289
% RIA	33,33	22,22	-11,11	NA

10

Tabla 20: Modelado lineal multivariante para cambio en puntuación WOMAC total, con individuos clasificados como no sensibles mediante la prueba de diagnóstico (MAD100 n=9, MADPL n=3)

término de modelo	coeficiente de regresión	error estándar	puntuación Z	valor p (GLM)	LR ji cuadrado (anova)	valor p (anova)
Interceptación	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 [hembra; varón]	43,01	33,47	1,29	0,2461	1,65	0,1987
Grado Kellgren-Lawrence [2;3]	-19,53	34,44	-0,57	0,5911	0,32	0,5706

5 Tabla 21: Modelado lineal multivariante para cambio en volumen total de cartílago con individuos clasificados como no sensibles mediante la prueba de diagnóstico (MAD100 n=9, MADPL n=3)

término de modelo	coeficiente de regresión	error estándar	puntuación Z	valor p (GLM)	LR ji cuadrado (anova)	valor p (anova)
Interceptación	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 [hembra; varón]	-39,00	12,71	-3,07	0,0220	9,42	0,0022
Grado Kellgren-Lawrence [2;3]	7,00	13,08	0,54	0,6117	0,29	0,5925

Tabla 22: Resumen de resultados clínicos y opciones terapéuticas potenciales sobre la base de genotipos rs9005 y rs315952

	Grupo A	Grupos B y C	Grupo D	
	100 mcg	100 mcg	100 mcg	30 mcg
Cambio en puntuación WOMAC total	Empeoramiento WOMAC significativo en comparación con placebo	Cambio en WOMAC comparable con placebo	Cambio en WOMAC mayor que placebo	Cambio en WOMAC comparable con placebo
Cambio en volumen	Sin mejora	Mejora significativa del	Mejora significativa del volumen de cartílago (mayor aumento)	Mayor mejora del volumen de cartílago

	Grupo A	Grupos B y C	Grupo D	
	100 mcg	100 mcg	100 mcg	30 mcg
total de cartilago		volumen de cartilago	entre todos los grupos tratados con 100 mcg)	(significativamente mejor que 100 mcg)
RIA	2/9 individuos tratados (1/3 en placebos)	2/29 individuos tratados (0/17 en placebos)	5/7 individuos tratados (0/7 en placebos)	2/6 individuos tratados (0/7 en placebos)
Opción terapéutica potencial	No se benefician de terapia con FGF18	Tratar hasta 100 mcg	Tratar con 30 mcg	

Referencias

- 1) WO2008/023063
- 2) WO2004/032849
- 5 3) WO2006/063362
- 4) WO2009/135218
- 5) WO 92/15712
- 6) US 5,679,524
- 7) WO 91/02087
- 10 8) WO 90/09455
- 9) WO 95/17676
- 10) US 5,302,509
- 11) US 5,945,283
- 12) US5,605,798
- 15 13) WO 89/10414
- 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
- 20 18) The Merck Manual, 17th edition, page 449
- 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
- 25 23) Benjamini and Hochberg, 1995, J. of the Royal Statistical Society Series B(57):289
- 24) Wirapati et al., 2011, Ann. Hum. Genet. 75(1):133-45
- 25) Bateson W. and Mendel G., 1909, "G. Mendel's principles of heredity". Cambridge University Press; 1909. Available: <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.

28) Fisher RA, 1918, "The Correlation Between Relatives on the Supposition of Mendelian Inheritance". Available: <http://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/handle/2440/15097>.

5 29) Browning SR and Browning BL, 2011, Nature Reviews Genetics. 12(10):703-14.

REIVINDICACIONES

1. Un método para pronosticar la gravedad de un trastorno en un individuo que tiene osteoartritis, comprendiendo el método las etapas de:

- 5 a. determinar, a partir de una muestra de ácido nucleico, la presencia del genotipo G/G en IL-1RN rs9005 y T/T en IL-1RN rs315952; y
- b. pronosticar a partir del resultado de la etapa a. una forma menos grave de osteoartritis.

2. Un método para pronosticar la gravedad de un trastorno en un individuo que tiene osteoartritis, comprendiendo el método las etapas de:

- 10 a. determinar, a partir de una muestra de ácido nucleico, la ausencia del genotipo G/G en IL-1RN rs9005 y T/T en IL-1RN rs315952; y
- b. pronosticar a partir del resultado de la etapa a. una forma más grave de osteoartritis.

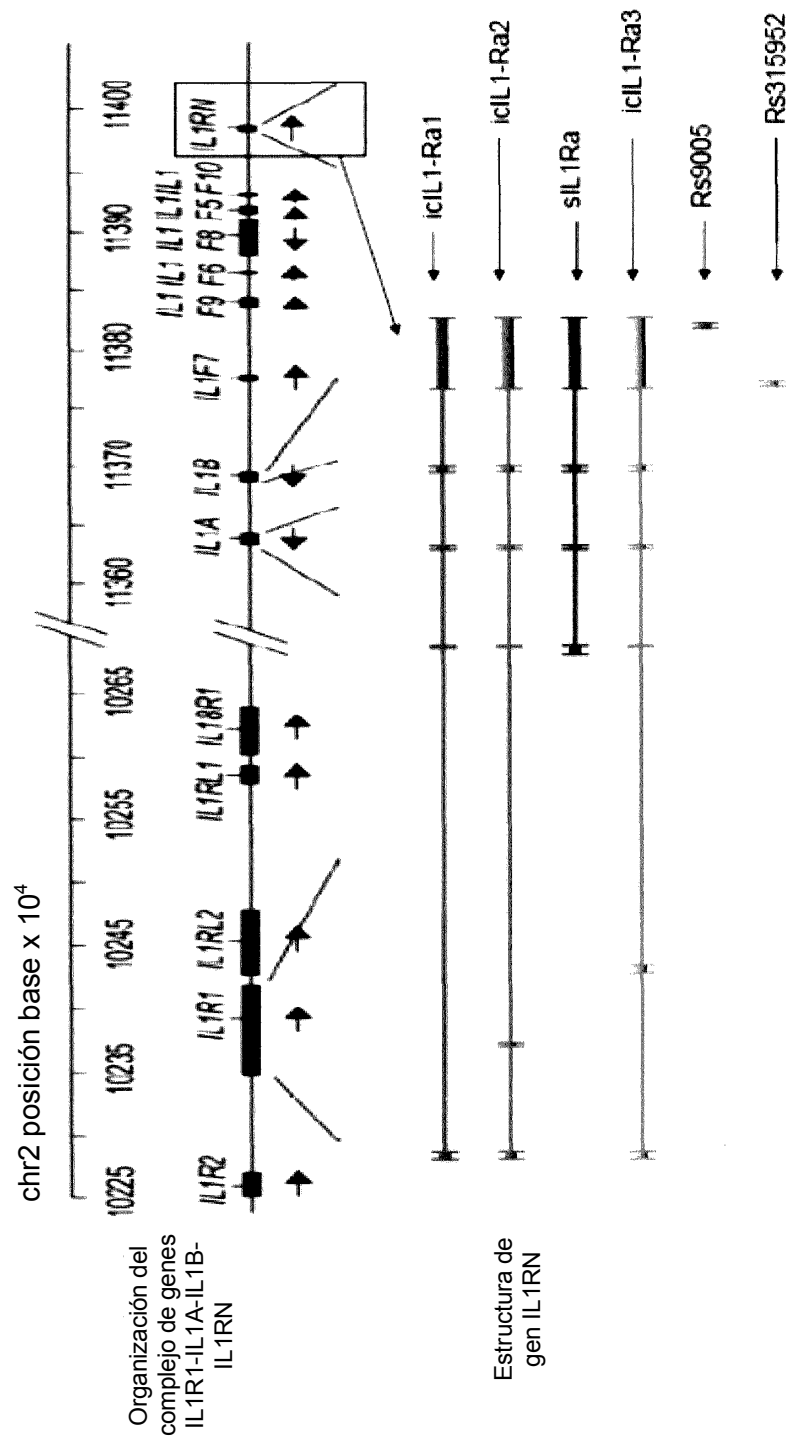


Fig. 1

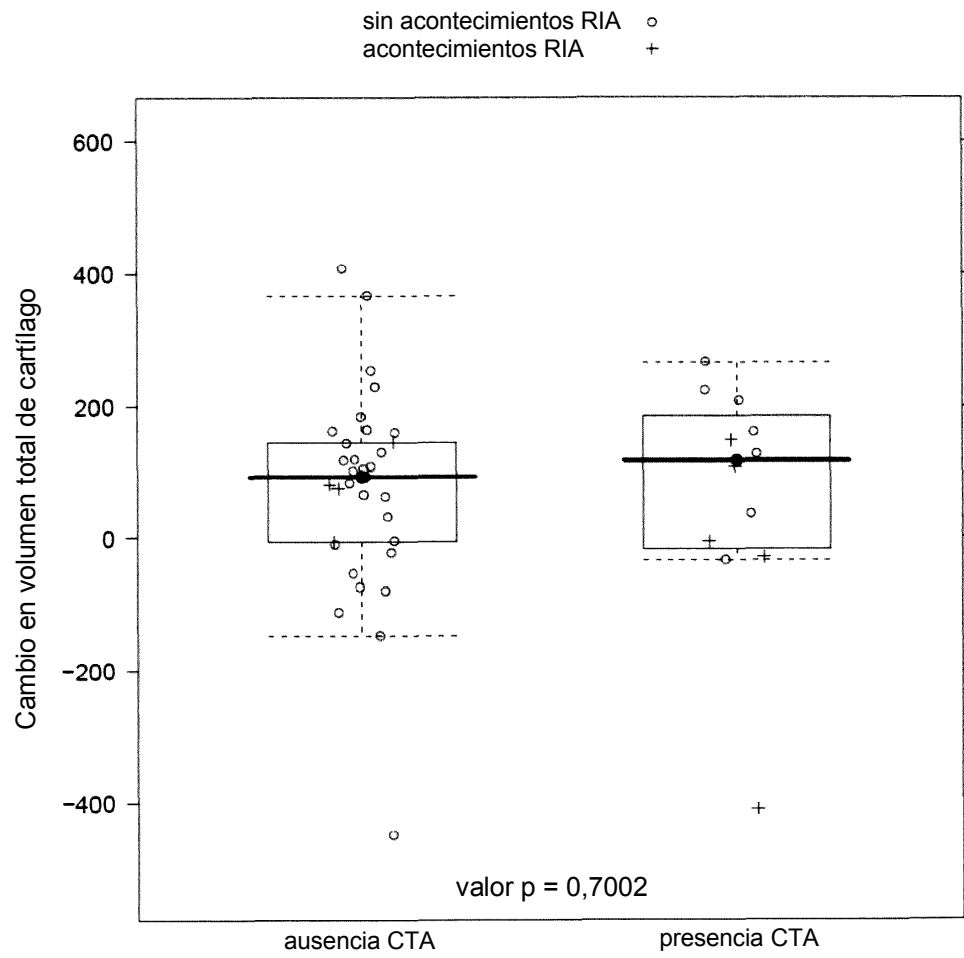


Fig. 2

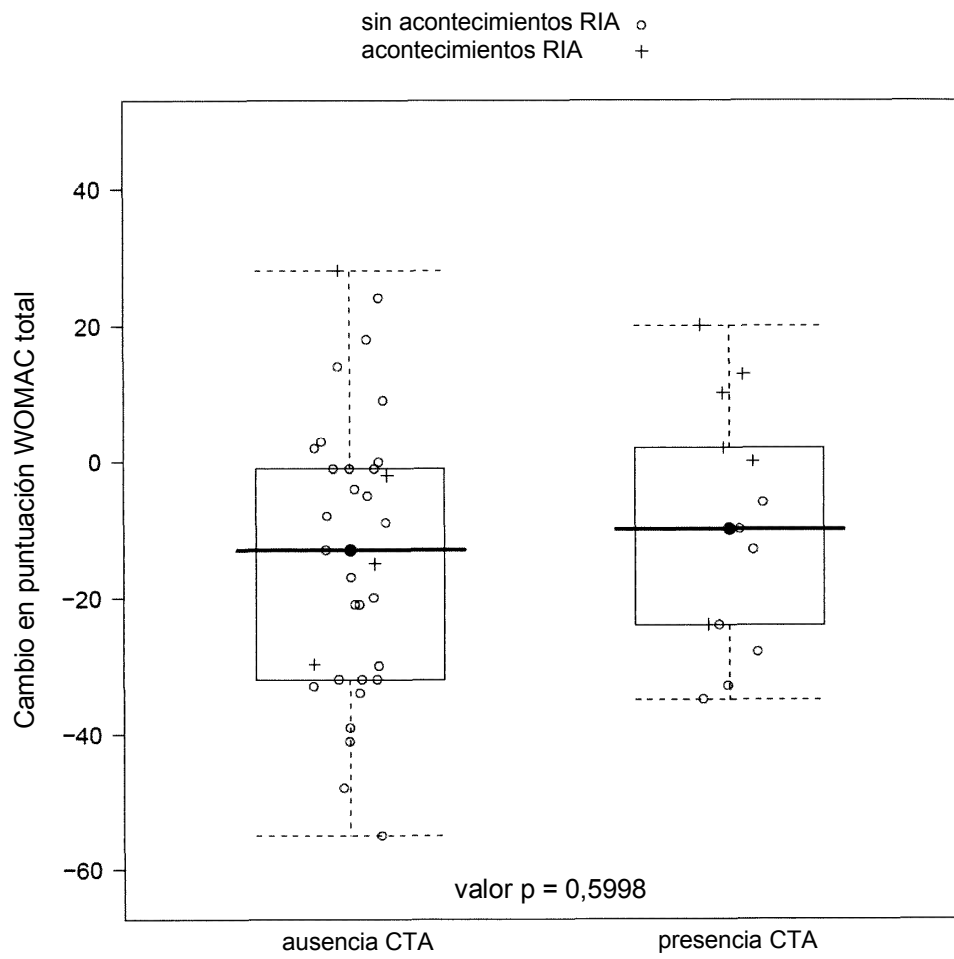


Fig. 3

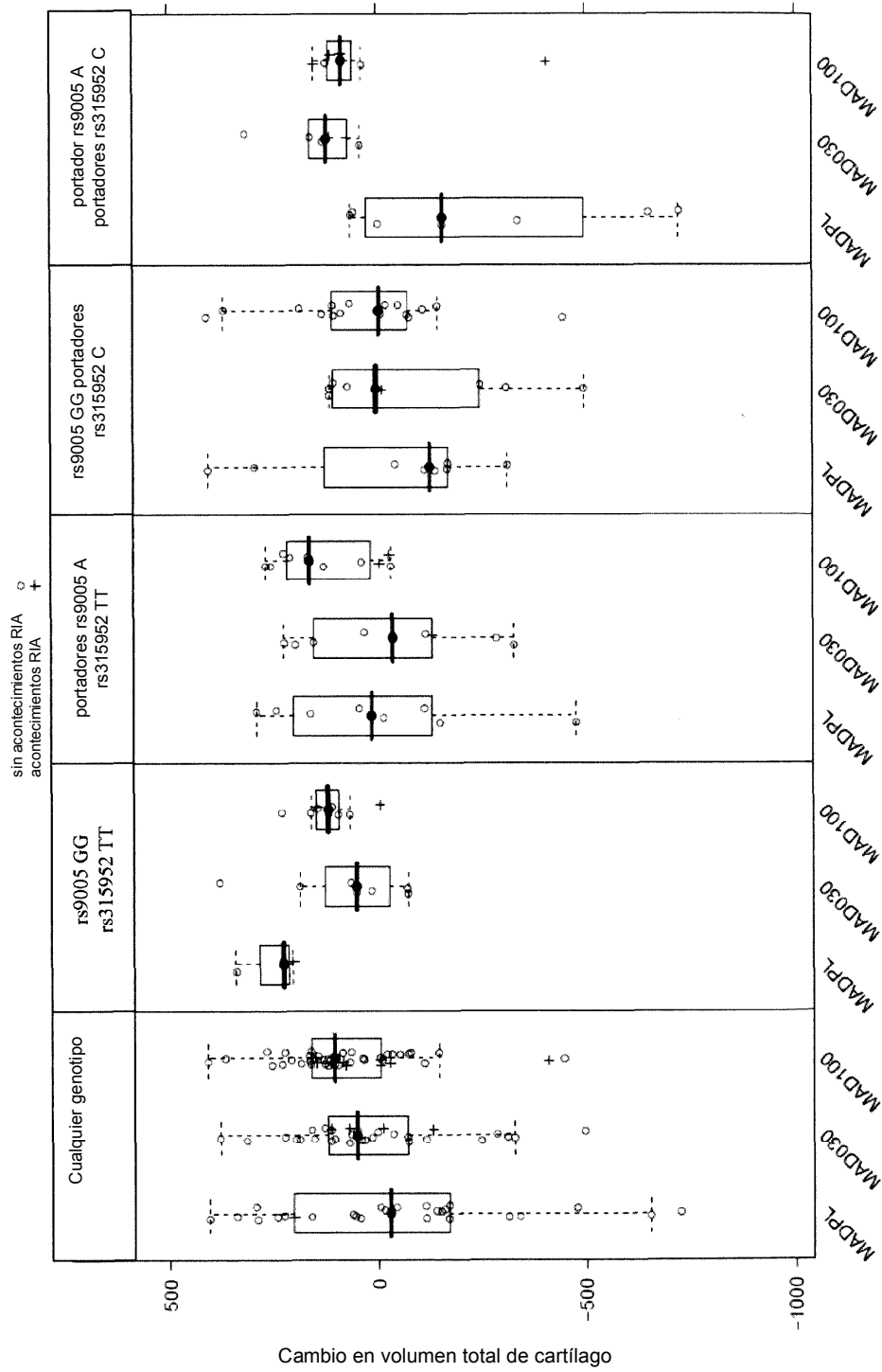


Fig. 4

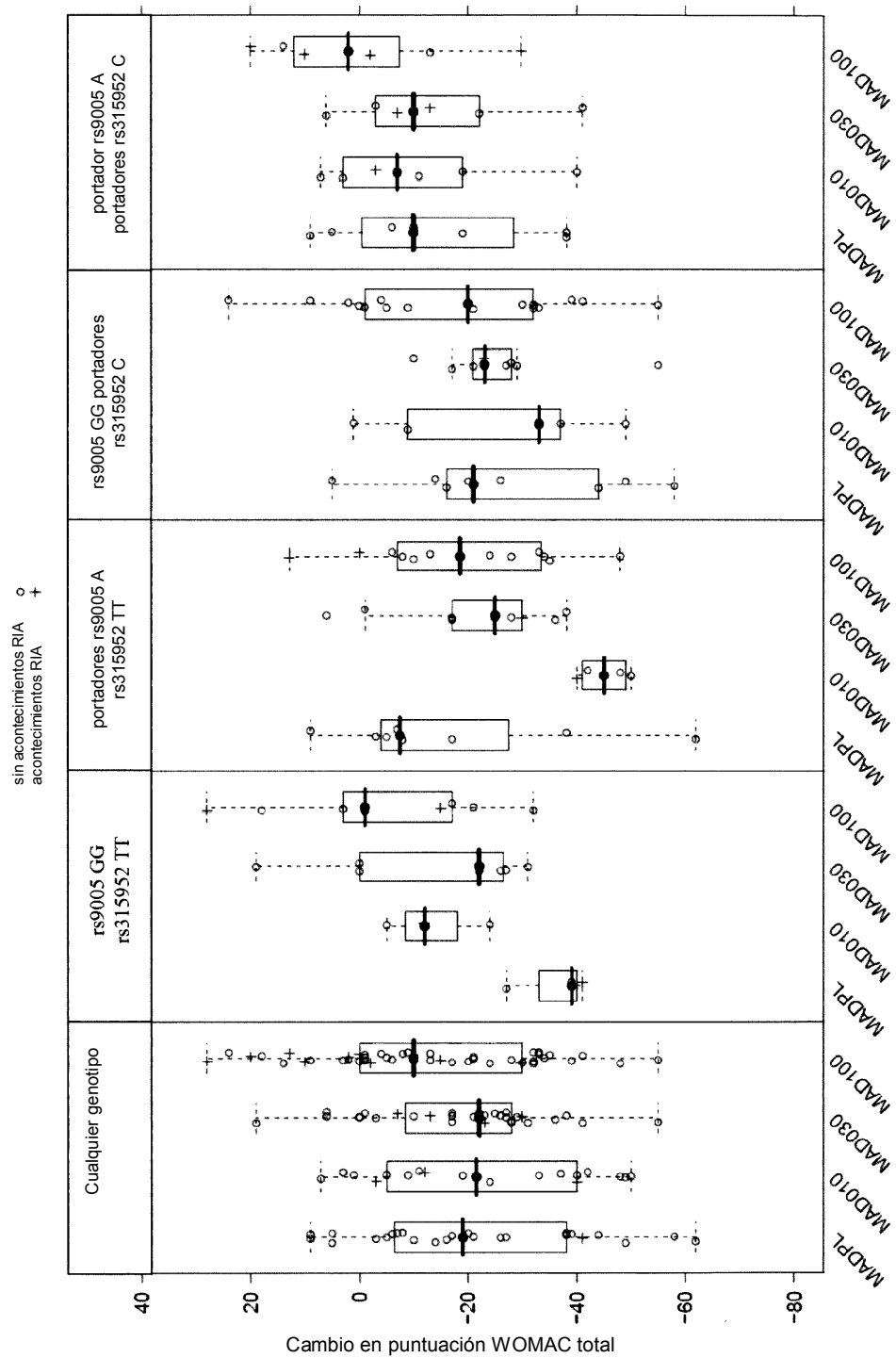


Fig. 5

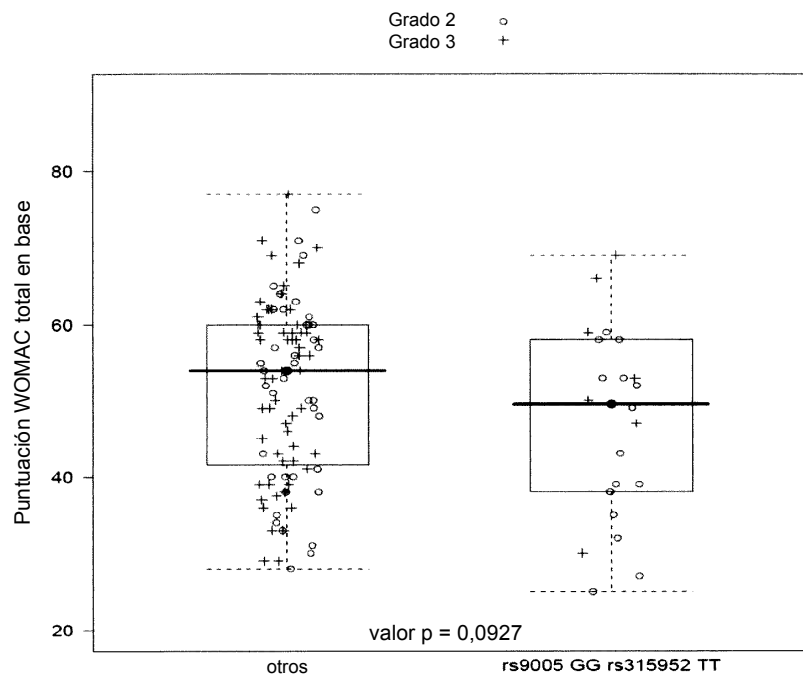


Fig. 6

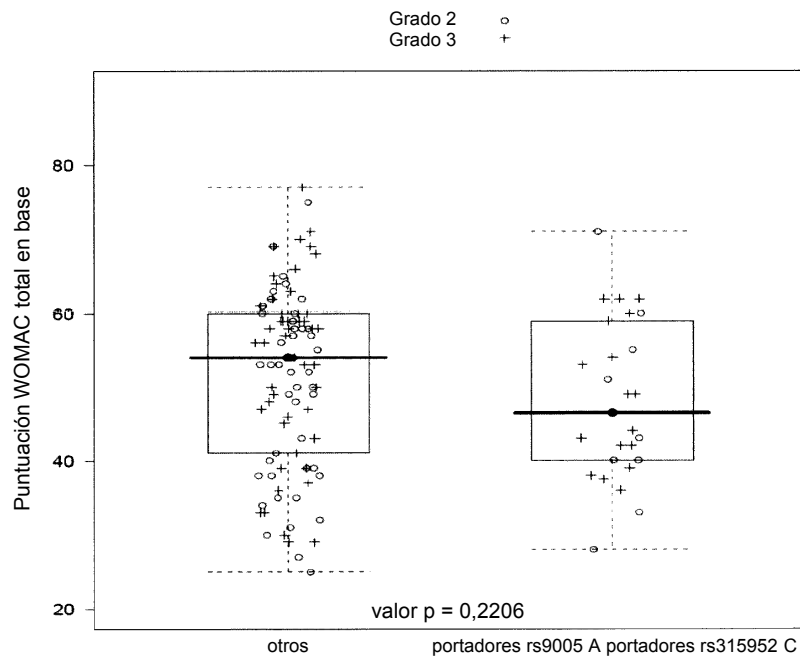


Fig. 7

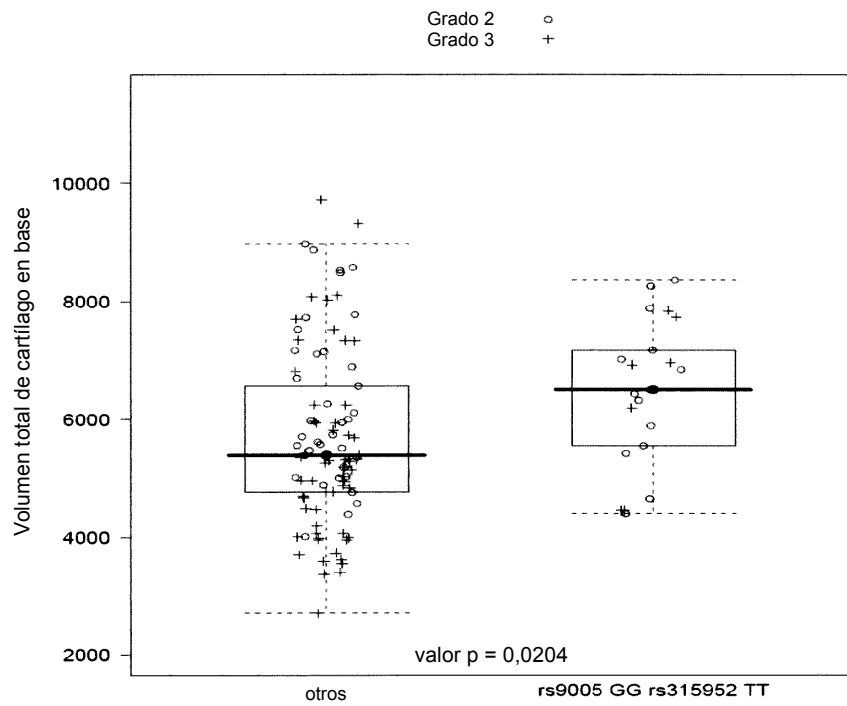


Fig. 8

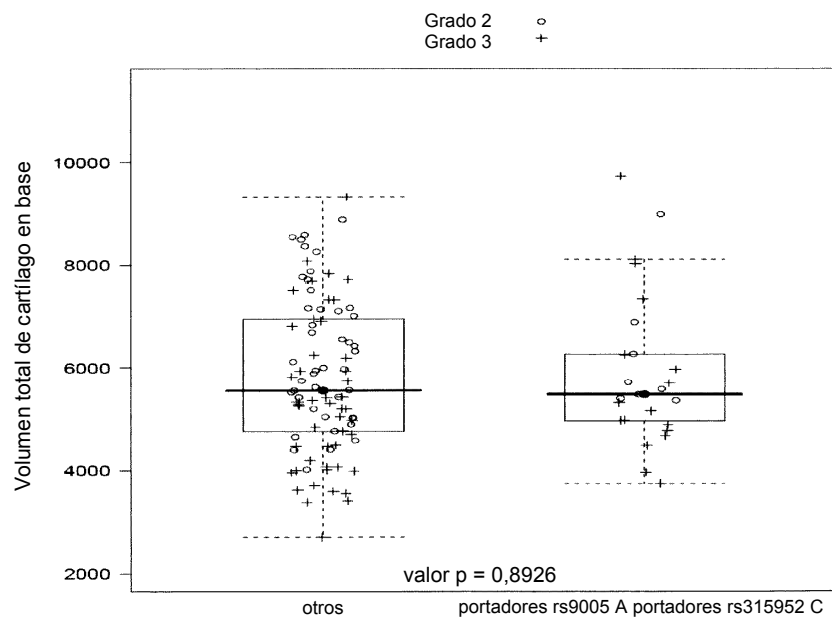


Fig. 9

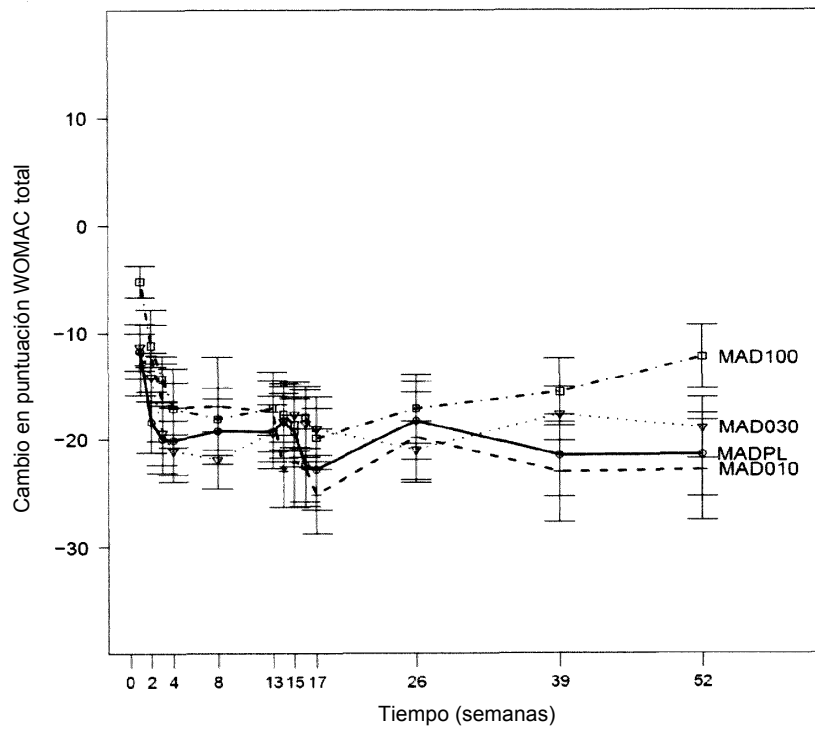


Fig. 10

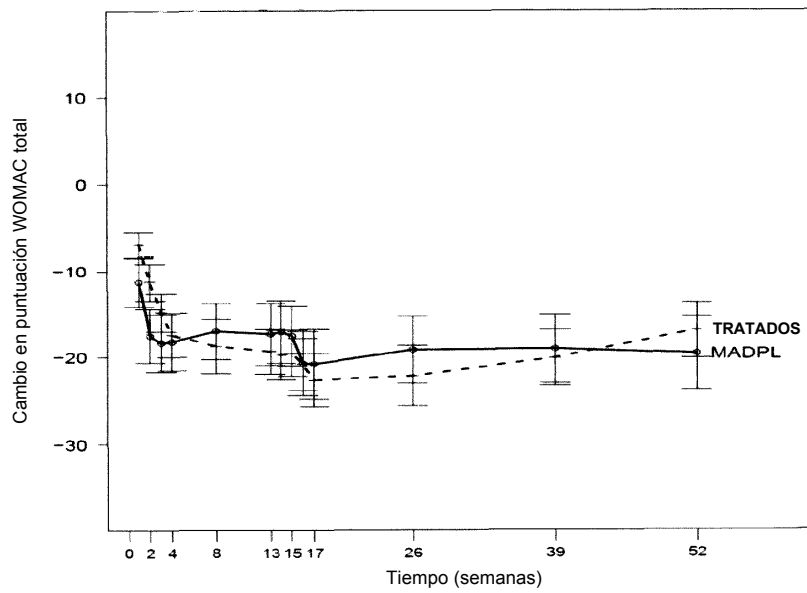


Fig. 11

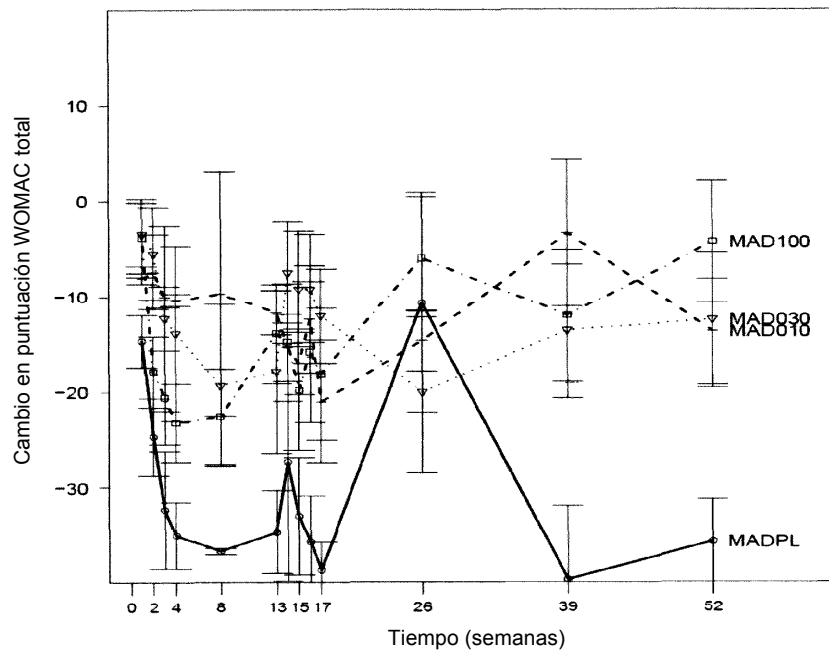


Fig. 12

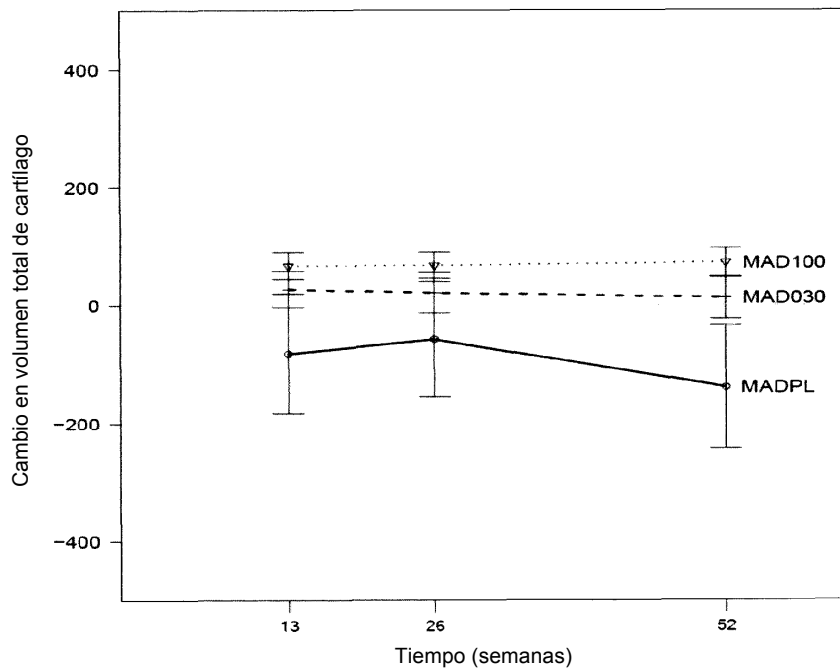


Fig. 13

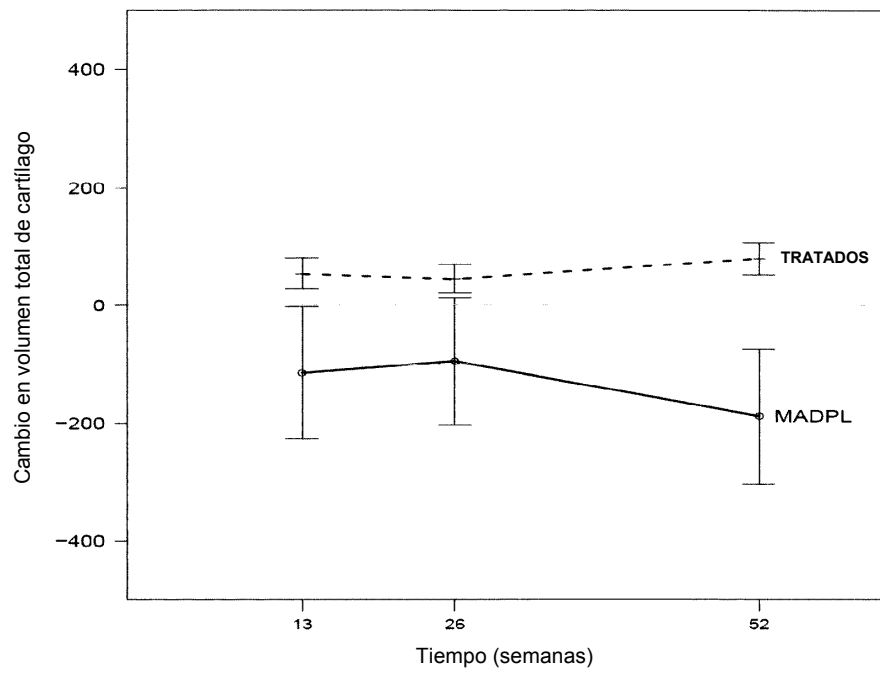


Fig. 14

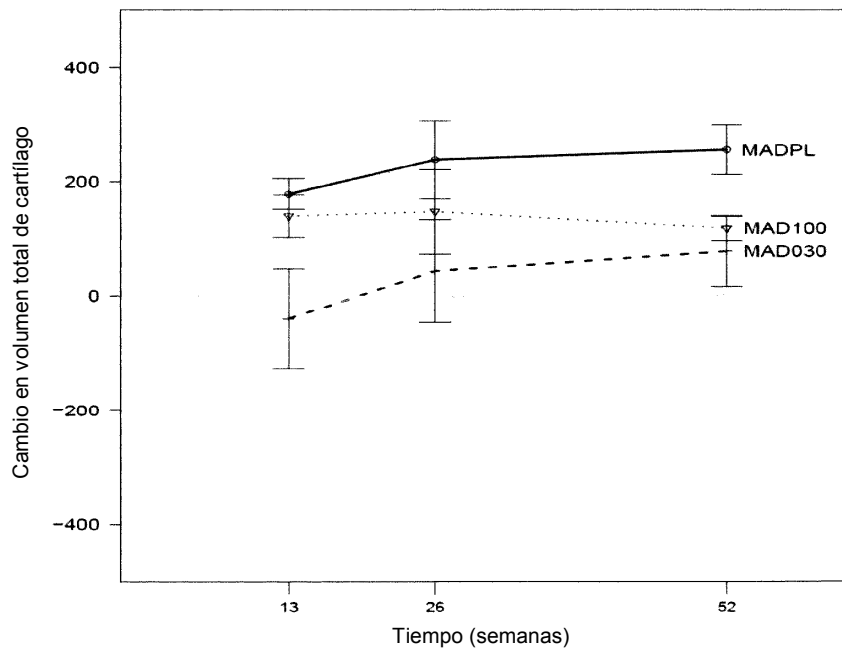


Fig. 15

SEQ ID nº 1: Secuencia de aminoácidos de la FGF-18 humana nativa

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 de la FGF-18 truncada 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 n° 3: Gen IL1RN

gggcagctcc	accctgggag	ggactgtggc	ccagggtactg	cccgggtgct	actttatggg	60
cagcagctca	gttgagttag	agtcctggaag	acctcagaag	acctcctgtc	ctatgaggcc	120
ctccccatgg	cttttaggtaa	gctccttcca	ctctcatttt	ttcacctgag	aaatgagaga	180
ggaaaaatgtc	tacaattggt	gtttatcaaa	tgcttttcagg	ctctgggtgag	caagcgtcca	240
ggaaaaatgtc	aagcgcattg	agctccaggc	ctgtctgggg	gatctgggca	cggggaggca	300
tccatgggag	accatgcagg	cactctgagg	caggggctgc	aagcctagt	cctgctgggg	360
cagcagggtga	acagagaggt	gtaactgctg	tgacagaagt	catggagtcc	ttggagtgtg	420
agggtcatctt	tccactgttg	atagaatagg	gaaattgggtg	aaatagccct	gttaaatgag	480
agaaagaaca	gtgtgagctc	aatgagaaat	actaatagaa	tgtggcactg	agccacaagg	540
tctgaggggt	gattgataag	gaaggggtgg	gactgtggag	aattaagggc	ttggcacagt	600
cagttccacc	agttgtcaca	agagaatgca	ggctcagggtg	gccagaactt	ctcgcttttc	660
cagaagagtc	cgatattctg	atttcattat	atatagtatt	ctgattaaac	cagacaataa	720
agcaagcaga	taaaatattt	aaattataag	ctgccagttt	gcaacctccg	gttaggattt	780
gtgtggggca	aagaaaaaaa	ctctcaggat	cattgtgtatg	tagactctaa	ttttaagttt	840
ctaattttaa	attggccctt	gaggctgggc	gtgggtggctc	acacctgtaa	tccagcattt	900
ttggggaggcc	aaggtgggtg	gatctcttga	ggtcaagagt	tcaaggcctg	cctggccaac	960
atggtgaaac	cctgtctcta	ttaaaaatac	aaaaattagc	tgggcatggt	ggtgcatgtc	1020
tgcaatctta	gctacttggg	tagctaaggc	aggagaattg	ctggaaccgc	ggaggtagag	1080
gttgcagtga	atggagatga	caccactgca	ctccagtctg	ggcaatagag	agagacgctc	1140
tctctaaaaa	aaaatatgta	aagataaata	aaatgaaata	aaataggcct	ctaatagaca	1200
ggccattctc	ctttctgggt	cttactttcc	ttgcactcct	ttctgggtgt	taagaggagg	1260
tctagaggaa	gctggacaac	tcttagcttg	tagtaagcac	agtgggaagt	tcagctctta	1320
atgggtcatg	gacacgttac	aagctaggcg	ccttgctgag	cactttacat	ggtttatccc	1380
actgaaccct	ctcaataaac	ctatgaggaa	gggctattat	tgctcacatt	ttcagaagag	1440
qaaatqgata	taqaaqatt	aqataatttg	cccatggcca	gacagctagt	ataagaggag	1500
gaggtggatt	gactgcagac	attctgtctt	caaaccacta	cactatgcta	tgggggcaca	1560
gagacttaat	gaaatcatgg	agaggggaat	tgctttgtca	accacaagca	gttattccgg	1620
gggcagcaga	tcctccccctg	tcctccagtg	ggtacaatgg	tccttggtgg	gttgtgtctac	1680
aatgtttagcc	catggtctta	tgtgttttcc	aaatgtgtaa	agtaggatgc	tggaaaccact	1740
cttagaacca	gataccaata	cattgtgaag	aaataaatct	ctgtgcttaa	aactgggtca	1800
tcccacaaata	ttttgaaactg	acacacaata	ggtgctaaat	aaatgtgtgt	taacttgaat	1860
tggattgaa	tcgggaaaaa	agtgcaataa	gcttagtgaa	gacaccatgt	tcctgggta	1920
gagggaaccac	attctccatc	taaggccagg	agtatgggag	gtatcaatgt	ttgccagca	1980
cagaacaggg	tgccaagaag	agaaaagtgt	acgggggtgca	tactcggact	ggaaactgga	2040
agggtgagaa	cagagggtaa	aggatagaga	tggaaccatg	tgcatacact	ttgtgttacc	2100
ttggacaagt	cattcatttc	tctggaccto	tgctttctct	ctacacaatg	gggtcccacc	2160
acttccctta	cagctgactt	gtatgaagaa	ggaggtggag	gaggaggaga	agggtgaagac	2220
aatgctgact	caaagggtaa	attattttta	ggatccaagt	ttgaaaacaa	ttttaggcta	2280
ctagatatga	acaacatctt	gattatgtag	ttgaaggaaa	ttaaagatga	atgggttaat	2340
taaaaattaa	tcagaatgaa	aacgattgat	tactaatata	tctgcaatgg	tttattttcc	2400
tgagtggcag	actcactaag	gtttttgaa	actcctgtgt	gattgctcta	tgtatgtatg	2460
tatgtatgta	tgtatgcatg	tatctatcta	tctgttgtct	aataaaatgg	atcacatctc	2520
tgctaataaa	aacactacac	tggcagggtta	caattataat	cattaaactgt	gcctggaatt	2580
tgcagcagca	gccaccagag	gtaccagtgc	cctttaaggg	ttcataattt	agaataatcc	2640
aattatctga	gtttttcagg	gactgagggg	tttggcaagg	tgtagaactt	tcagtaataa	2700
agtcagaana	gtcctggaca	aaccaaggta	gttgggtcact	ctagtccata	accaggtaaa	2760
gagctttccc	tgtaacctgt	gtaagggttt	agaatcattt	ctttccctat	tacccaaaaa	2820
cctccccaaa	ttttcaagaa	attatgaact	aaatagtta	tctatgagat	aggagttcag	2880
cccaaaagaa	acaccataag	aacaaatata	attcttgcct	atgttaacca	tgcaatgaag	2940
cagagagaaa	aagtgcagtgg	cctctttagg	aggactgtag	tgtgggaaga	aataactaaa	3000
ctgggtttca	atcctggcct	ggccaggatc	tggagcaagt	gagttaatct	ttctaagcct	3060
tgagtagtct	cttctctctc	ttcttctctc	ttcttctctc	ttcttctctc	ttcttctctc	3120
tccttctctc	cttctctctc	ttcttctctc	tccttctctc	cttctctctc	ctcctctctc	3180
tccttctctc	cttctctctc	ttcttctctc	tccttctctc	cttctctctc	cttctctctc	3240
tccttctctc	cttctctctc	gtcttctctc	tattttcaaa	gtgaaagcaa	gtttattaag	3300
aaagtaaaag	aataaaagaa	tggccactcc	atagacagag	tagcctgaac	cttgagttct	3360
tctataaaag	cactatgaat	tttactcat	tttgaaagt	gggtgcaata	tgtctgtcca	3420
ctttgcacag	ctgttatgtg	gacaaaagga	gatctgtgtg	aaagtgtaac	acagagccta	3480
aactataaca	ggtaagcaac	acagttgtcc	ccttccccat	gggtgtctgt	cttctccatt	3540
tcctcctgtc	tgcaggggga	ttataaaact	aatcatcaaa	gccaaagagg	caagagcaag	3600
catgtaccgc	tgaaaaacaca	agataactgc	ataagtaagt	actttcagtg	cagattcata	3660
gctaaccocat	aaactgctgg	ggcaaaaatc	atcttggaag	gctctgaacc	tcagaaaagga	3720
ttcacagtaa	gttaaccatg	tagatctgag	aggagagtag	cttctttag	ataacagttg	3780

Fig. 16(b)

gattatatac	catgtcctga	tccccttcat	catccaggag	agcagagggtg	gtcaccctga	3840
tagcagcaag	cctgggggct	gcagcttggg	gggtagagggt	actcaggggt	acagatgtct	3900
ccaaacctgt	cctgtgcct	tagggagctt	ctaataagtt	gatggatttg	gttaaaatta	3960
acttggtac	ttggcaggac	tgggtcagtg	aggaccaaca	aaaagaagac	atcagattat	4020
acctggggg	tttgtatctt	ttgtgtttct	ttctcttctt	tgtactaaaa	tattttacca	4080
tgactgggaa	agagcaactg	gagtccttgt	agcattatct	tagcaaaaat	ttacaaagtt	4140
tggaatacaa	tattgcccct	atgtgtgtgt	gtgtcctgtg	acactcagga	ttcaagtgtt	4200
ggcgaagcc	actaaaatgtg	agatgaagcc	attacaaggc	agtgtgcaca	tctgtccacc	4260
caagctggat	gccaacattt	cacaaatagt	gcttgcgtga	cacaaatgca	gttccaggag	4320
gcccacatga	aaatgtttgt	actgaaattt	gttaaaagctt	ccccacaaac	tagattttatc	4380
agtaaggatt	gttttctgca	aggggatga	aacttgtggg	gtgagccatt	tgggctgagg	4440
aggagggagg	ttggagctga	gaaatgtgga	gacaatttcc	ctttagaagg	actgaatctc	4500
cctgcctctc	tggggtgcgg	cagccagcag	gatccaatgg	tgtatatgtc	tccccagctc	4560
cccattcagt	gatatcatgt	cagtagcttg	aaattatccg	tgggtggagt	attatgtcat	4620
ggaaattggc	aaatggaac	ttttattgga	gattcaattg	ttaaaccttt	accagcacaa	4680
cactgcctgt	ccttcagagt	caatgacct	atccaagttt	aatccatctg	tccactgtct	4740
ccaacacgat	ctttataaaa	cacacctgac	aacattaccc	ttttattcag	ttttttaaaa	4800
gataagtttc	cagctcatcg	ggctggcttt	aaaggccatt	tctcctctgg	acctcaccca	4860
actttttcaa	tcaacttttc	tacccttacc	tctaaatgct	actcaaaact	cagccatcct	4920
gaataataag	acttttgaaa	agtagattat	gggctgggca	cagtggctca	cacctgtaat	4980
cccagcactt	tgggaggcca	agatgggtgg	atcacctgag	gtcgggagtt	cgagaccagc	5040
ctgactaaca	tagtgaacac	ctgtctctac	taaaaataca	aaattagttg	ggggtgggtg	5100
cacaagcctg	taatccccagc	tactcaggag	gttgaggcag	gggaattgct	tgaacctggg	5160
aggcggaggt	tgccgtgagc	ctagattgct	ccactgcact	ccagcctggg	caacaagagc	5220
gaaactccat	ctcaaaaaaa	taaaaaata	aataaaagtag	attacatcag	atacctctgg	5280
cctaggttgt	ttatgaccaa	ctctcctgt	gagaataact	agaaaagcta	gacaaaacat	5340
atttccaaaa	gatctctttg	gaggcatcag	agaatggcca	aggctgtaag	gaactgcctg	5400
agcccagaga	ggtggagccc	agcactggtg	ccctttactc	ctggggacat	gtgctggttt	5460
caaaaacttc	agctgagttt	ttgagcattc	atggaaacttg	gtgggggaga	tgaaatttgt	5520
accttaaatc	ctgcctacac	ggagggtccc	tgataatccc	cacccaattt	ggaaatctgg	5580
gtcagccttc	acaggtaactg	aagccctcct	ctgaatgatc	tcaagtccctg	ctagggtaga	5640
ggttacctgc	ttttgaaagg	ctcctggcct	acctgtgcag	caggagcaaa	agtgaaccat	5700
ctcagggtag	agataacaat	caccagagc	cttgaatgac	ctctactgtg	cttaatatat	5760
agtattcagc	agtcagtaaa	aaggatttag	gcacatgcaa	gatgacctgt	gtatcaggga	5820
gaaataggca	ataaattgag	atccagcagg	gatttgaatc	atggatttga	atcaggggca	5880
gccttcgaaa	gaactgtgga	gaatatactc	agatttataaa	cataagattg	gaatttttgg	5940
cagagaacta	acaactgtac	aaaaaaggaa	ccaaatggaa	atcctagaac	tgaaagatgc	6000
aattaaccga	tgttgagaaa	tagccaacat	ctattgaaca	cttcccatgt	ggacagctgt	6060
gctaaacact	ttacaggcat	caacataaga	tgtgtccctt	tacagcagtg	cagtgctcct	6120
cctaagacat	ggacagcctg	gtttccctat	ctctctgctt	catcaaaaacc	cctttacgtg	6180
gggcttagac	actcctgttg	tctctagtgt	ctagtagcac	agggtctcagc	acatggaagc	6240
cactagatac	aatttgatga	ccaggacctc	cgatgaaagc	catgggtgct	gattgggaa	6300
gcattgtctt	ttatgtgcta	tggctcttaa	gcttcatcca	ggaagcagaa	ctcggggggg	6360
gctgaggacc	cagaaccgag	aataagatta	gtcagagatt	tcctgtgggc	agaaatcata	6420
aggacgccaa	ctggttgggt	gagataagac	gaaaccaaga	gtggacttgt	ggccagaagc	6480
gtgaggaaga	gggagagagc	ttcccttgtc	ccctttcttc	ctctccctaa	gccacagtga	6540
ttgacagccc	cccccttttg	gagtcagagc	aggcttgaga	ctggactggg	aaaggagggt	6600
gggtcaggat	acagagcagg	aaggctggga	gtgcagggca	ggagcaaggg	gctggggcat	6660
tcatttgtcc	tgatctctcc	cactttacct	ggggtaaaga	agcatatgca	aaagccacgg	6720
tgtgagtatt	tcccaagtgc	cagggtcagg	gcattgattca	tcacgtgcag	catttcattc	6780
aatccttata	gtaaccgatg	atgtggcttc	tattattagc	tctatcagat	aatgaaactg	6840
agaccaagac	aggctctgca	cattgtgtgg	ggtaatgaca	cagggggatt	cagacctaga	6900
ctccataact	cctgccccag	ggaccacccc	caccttcacc	ctgtgcatgt	cgacaaagga	6960
cagactgggc	cacttctcag	gacacagcgg	ggaaatgaca	cagagcaggg	aggttccagg	7020
agccccgagc	gtcttttctc	caggagaata	ctctctgaat	tcagactggg	gtcagagaaa	7080
catttaccga	ggagccgcag	tgtgggtggg	gctttttact	tgaacgcctg	tctgaaggca	7140
gtggccaggga	tggagactctc	caccctacct	tggcaagcca	cttctcttct	gcaatctgta	7200
aggacattgt	tgagagaatt	atgtctctcc	aattccggag	gggtgaagaa	agacaaatag	7260
gagagaacct	atcatagtca	ggtgctagct	gccttctctt	tcagagagtg	tgagaataaa	7320
gtgatatact	tgattattag	caaatacttt	ggaaatttta	aacgctaata	ttcaacacac	7380
tctggaagag	gcaaataggt	agacagggtc	atatacatca	tctccttcag	ctagtctctca	7440
caaaaacaaa	caaatgaata	aacaaaatcc	ttcttttgcc	ctcataggaa	gacactgttt	7500
cttgaacgtg	tttcaaaaag	gatgggtgac	tcactcaagg	tcacactgtt	tatgaggaca	7560
gtacaggaat	acagacatgc	cattttgcct	gaaaaaatcc	atcacccagg	gaggtgacac	7620

Fig. 16(c)

aattttgcag	aaatgttcta	ttctctctga	aggatacatt	ctttaaacct	ttgggaaatt	7680
cattcatagt	cttctctcct	tgaaggatta	actctcttga	cacaaagtgt	ttgattctga	7740
tttggttggt	ggaagatgtg	ttgggttgaga	gaaagattct	gatttgggtg	ttgaaaaatag	7800
actcatcaag	atcaactgct	gtagtagtaa	atattttgac	attttgtctg	tattcctgtg	7860
ctgcccctac	aagctgcac	accttgagtg	agtcattcat	acttttttgt	ttgtttttgt	7920
tttgagatg	gagtcctact	ctgttgccca	ggctggagtg	cgggtggcgtg	atcttggtc	7980
actgagacct	ccatctctctg	ggttcaagtg	atctctctgc	ctcagccctc	cgagtagctg	8040
ggattacagg	cacatgccac	catccctgct	aattttttgca	ttttcagtag	agacggagtt	8100
tcaccatggt	ggtcagggtg	gtcttgaact	cctgacctca	ggtgatccgc	ccacctcagc	8160
ctccccaaagt	gctgggatta	cagggtgtgag	ccaccgtgcc	cagcccgagc	atcatttttg	8220
aaacacggtt	gagaaatagt	gtcttccctt	gagggccaaag	gagacatttt	ttttgtttat	8280
ttgtttgttt	ttgtgaggac	tagctgaagg	gggtgatgta	tattaacctg	cctacttatt	8340
tgccctctcc	cagagtgtga	tgaatattag	ggtttaaagt	ttctgaagca	ttgtttaata	8400
aagcccggtg	ctggagggtca	gaagacctgg	atctctctgc	atacttttgc	catcagcaag	8460
ctgtgtgacc	ttggacagat	cccttttttg	tctaatactt	tctgagtcct	cttgaaaaca	8520
atgccagggt	gggacaggat	gattgccaa	ctcccgcca	gctctaaaac	actgcaacgt	8580
atgcttctgc	accagcactg	tccatctctg	agatcatgca	gaaattctct	tcaacttttt	8640
cctaccata	aaataggagc	atgcttaact	ttttccta	gttccaggcc	ccgggtctag	8700
aatattgtaa	gtaagggaag	taattgtgtat	cagagcccat	tatgggccag	aagttctcct	8760
cttctctcct	acacctgctt	cctccctccc	tccctccctc	tttcccttcc	ttccttccat	8820
ccatttgtga	agaagacatg	atcacctcca	ttctgagagt	gaagagacag	aggctcaact	8880
aatgaaatga	tttgttcaag	gtcacacggg	tggcacaagg	caagtggcag	aggttgaatt	8940
tagaccatt	cctgtccaaa	tgctgagttt	atgtcatcgt	cccagagcca	taacttttaa	9000
gatgtaagat	agtgggaaaa	gagttgattt	caaagcacct	ctcagaagga	ctcactttac	9060
atcagggtgc	acgagactca	ggccaaatcc	ggctccattcc	ccgcttttgc	aaagaaagtt	9120
gtagtggaa	acagctaggg	ttattgattt	atggattgcc	aacgtccctt	tgtgaaacag	9180
acagctagag	tgagttaatc	tgccgcacaa	aacctaaaat	atttactatc	tctgctctta	9240
cagaatgttt	gccaatctat	ggccggaggt	ccaaggctgt	ccatttttca	aagaacacaa	9300
agtgcacatga	gactgtccca	tggtgcaggga	gccctatcat	tttattatga	aaaaacggcc	9360
tttctgtcca	aatctgtttt	ttaaaaagtc	aacaaacaga	ctctgggtac	ctgtcaggaa	9420
cagtagggag	tttggtttcc	atttgtctct	tcttcccagg	aactcaatga	aggggaaata	9480
gaaatcttaa	ttttggggaa	attgcacagg	ggaaaaaggg	gagggaaatca	gttacaacac	9540
tccattgcga	cacttagtgg	ggttgaaagt	gacaacagca	agggtttctc	tttttgga	9600
tgcgaggagg	gtatttccgc	ttctgcaggt	ggggcagggt	ggcagacgcc	tagcttgggt	9660
gagtgcactat	ttctttataa	accacaactc	tgggcccgcga	atggcagtc	actgccttgc	9720
tgcagtcaca	gaatggaaat	ctgcagaggg	ctccgcagtc	acctaatac	tctcctcctc	9780
ttctctgtcc	attcagagac	gatctgcga	ccctctggga	gaaaatccag	caagatgcaa	9840
gccttcagg	aaggctaccc	caaggaggag	aagggtgagg	tggtatcagct	ggagactgga	9900
aacatatcac	agctgtccag	ggctgccagg	ccccagagg	cctgagaact	gggtttgggc	9960
tgagaggat	gtccattatt	caagaaagag	gctgttacat	gcattgggctt	caggacttgt	10020
gtttcaaaat	atcccagatg	tggtatgtgc	gaccggagg	ctgtcttact	ttcccagaga	10080
ctcaggaacc	cagtgcagta	tagatgcagt	ccaaggagtg	ggactgcgat	tcaggcctag	10140
ttgaatgtgc	tgacagagaa	gcagagagg	gcaccagg	cacagcccga	aggcccagac	10200
tgatagggc	aaggcctgtc	tggtgtgaca	tgctggagg	tccactctc	cagggacctt	10260
gggttccccg	tctgtgacat	ctgtgacatg	agagtcacga	taactccttg	tgtgccttac	10320
agggttgttg	tgaaaattaa	atgcacagat	aatagcgtaa	cagatttccg	tgcattgtaa	10380
agagcctgaa	aaccattatg	atttgaaaat	ggaatcggct	ttgtgagacc	atcactattg	10440
taaagatgtg	atgctgatag	aaatgacagg	actgcttgtg	catgccctct	gcagtgtgac	10500
attccagcag	tgaaatcatg	ttgggtgac	ttctccccca	ctctgacctt	tatgtttgtc	10560
tgggccgagg	ctgcaagtcg	ggctctgtgg	gtgtatgagt	gacaagtctc	ttccttccag	10620
atatggggac	tgtctgtctc	cctagggtgc	ctctccctgc	tctgatcagc	tagaagctcc	10680
aggagatcct	cctggaggcc	ccagcagggt	atgtttatcc	ctccagactg	aggctaaatc	10740
tagaaactag	gataatcaca	aacaggccaa	tgctgccata	tgcaaagcac	tttggtttgc	10800
ctgcccaccc	ctcgtcgagc	atgtgggtcc	ttcagagcca	cctgatgagg	tggttacagt	10860
tagccacact	tcacaggtga	agagggtgag	cacaggtccc	aggtcaggct	ggccagagct	10920
ctgtttatta	cgtctcacag	ctttgagtcc	tgctctcaac	cagagaggcc	ctttaccaag	10980
aagaaaggat	tggaacccag	aatcaggtca	ctggctgagg	tagagaggaa	gccgggttgt	11040
tcccaagggt	agctgtctct	gcaggactct	gagcaggcca	ccagctaaatg	gaggaaaggc	11100
tctagggaaa	gaccttctg	gtctcagact	cagagcaggt	tagctgcaag	gtgttccgtc	11160
tcttgaaact	tctacctagg	tgctatggta	gccactagtc	tcagggtggct	atttaaat	11220
atacttaaat	gaatgaaaat	agaagaaaat	ttaaaatcca	gaccttgggt	cacactatcc	11280
acatttaaa	aggtcaatag	ccacatgtgg	ttagtggcca	ccctattggg	cagtgcagct	11340
acagaacatt	tttgcatccc	agaaagtctc	tttggtgtgt	gctgctctac	agcatgcttt	11400
gctgaaacag	aagtgccttc	cctgggaatc	tcagatggga	agcaagtaag	gaggggagtc	11460
aaatgtgggc	tcactgctca	ccagctgtga	gggttggg	tgccctctaa	ccattgtcag	11520

Fig. 16(d)

cctcagtcctt	ctcatccatg	catgccgtgg	gtataactaaa	atactataacc	cctggaagag	11580
ctggatgcaa	atttgacaag	ttctggggga	cacaggaagg	tgccaagcac	aaggctgggc	11640
acatgggtggc	tgtgcactac	agctgagtc	ttttccctttt	cagaatctgg	gatgttaacc	11700
agaagacctt	ctatctgagg	aacaaccaac	tagttgctgg	atacttgcaa	ggaccaaagt	11760
tcaattttaga	aggtgagtg	ttgccaggaa	agccaatgta	tgtgggcata	acgtcacttt	11820
gcccgctctgt	ctgcagcagc	atggcctgcc	tgacacaaacc	ctaggtgcaa	tgtcctaata	11880
cttggtgggt	ctttgtattc	aagtttgaag	ctgggagggc	ctggctactg	aagggcacat	11940
atgagggcag	cctgaagagg	gtgtggagag	gtagagtcta	ggtcagaggt	cagtgcctat	12000
aggcacagt	gtcccagggc	cacagctggg	aaggggcaaat	accagaaggc	aagggtgacc	12060
attcccttcc	tcaagtcgct	attaaggctc	catgttccta	tgtgtgtcaa	accctaactc	12120
aatcccaaat	taatccacca	tgtataaggt	tgagctatgt	ctcttattcc	tggacaccat	12180
actcagccat	attctggtcc	acacattaaa	caagctggat	gaccttgaag	aagcttcacc	12240
cactctgttc	ctcagctttc	ccttcagtgg	gatgatata	actggacaac	aggatgtgcg	12300
attcttttag	ttccagccct	ccaggatgtt	ttcactcccc	tgtttgtgtg	tgtaggatgg	12360
tattacctcc	accttccacc	cttccctatg	ccctggttct	gtctcctgtg	cctcgctctg	12420
aaagtggatg	agacctacaa	ttctgttcct	ggtagttctc	ctaatagaaca	cactgaagca	12480
cgagggaagct	gagatttttt	ttgtctacat	agagcatgga	ggcctcttag	ggagagagga	12540
ggttcagaga	ctcctagget	cctgtggagc	cccactcatg	gccttgttca	ttttccctgc	12600
ccctcagcaa	cactcctatt	gacctggagc	acaggtatcc	tggggaaaagt	gagggaaata	12660
tggacatcac	atggaacaac	atccaggaga	ctcaggcctc	taggagtaac	tgggtagtgt	12720
gcctcctggg	gaaagtggag	gaaatatgga	catcacatgg	aacaacatcc	aggagactca	12780
ggcctctagg	agtaactggg	tagtgtgcat	cctggggaaa	gtgagggaaa	tatggacatc	12840
acatggaaaca	acatccaggga	gactcaggcc	tctaggagta	actgggtagt	gtgcatacct	12900
gggaaagtga	gggaaatatg	gacatcacat	ggaacaacat	ccaggagact	caggcctcta	12960
ggagtaactg	ggtagtgtgc	ttggtttaat	cttctattta	cctgcagacc	aggaagtga	13020
gacctctctg	cccttctgac	ctcgggattt	tagttttgtg	gggaccaggg	gagatagaaa	13080
aataccccggg	gtctcttcat	tattgtctgt	tcctcttcta	ttaacctgac	cctccccctc	13140
gttcttcccc	agaaaagata	gatgtgggtac	ccattgagcc	tcattgctctg	ttcttgggaa	13200
tccatggagg	gaagatgtgc	ctgtcctgtg	tcaagtctgg	tgatgagacc	agactccagc	13260
tggaggtaaa	aacatgcttt	ggatctcaaa	tcaccccaaa	accagtggtc	ttgaaacaac	13320
caaaattttt	tcttatgatt	ctgtgggttg	accaggatta	gctgggtagt	tctgttccat	13380
gtggtggaac	atgctggggt	cacttttgaa	gctgcattca	gcagagtggc	tggcttgccg	13440
tgggcaccca	aggtgtgtcc	tcactctcca	ggctctcttt	ccatgtgata	tctcagtgtt	13500
taagagttag	ttggagcttc	cttacagcat	ggcggctgac	ttccaaaagg	gattattcca	13560
aaaagagcct	caacatgcag	gcgttatta	tgaactctgc	ttgcatacct	ctattggcca	13620
aagccagtc	cgtggctaag	tctagccccc	tgtgagagga	gactgcataa	gagtgtgaac	13680
accaggagac	acggtaactg	ggggccacca	ctgtaaccat	ctaccacagg	acctgaatct	13740
ctgtgtgcta	ctccctgtct	caagggccccc	cctaccacag	cagacctgct	gtcttctagc	13800
aaagccccac	ctcagagact	ttctcttcca	atccttattg	actcaaattg	attagtgtgt	13860
gctccaccba	gagccctgtg	ctcctttatc	tcattgtaag	ttaatgggtt	tccagccct	13920
gggaaaacat	ggctttgtct	caggggcttg	ctggatgcaa	gcttaacctc	aatgtgagtg	13980
gccatactgt	ggcactgtcc	catccctcac	cagggaacct	gttctggagg	gtgactgcct	14040
gttctgtgag	gagtggggat	ggctaggaca	ttgcatggaa	cacaccacca	ccccatcttc	14100
tcagagctca	aacctgtaca	gaacaccagc	tcacacagcc	ttggcttctg	ctgatggtgc	14160
cgtgtattta	ccagacttag	tggccaagg	ccagagtggc	cagatttccc	aaagtcaagg	14220
tgtgacagt	ggacagcctc	tttgtgtctt	tgtgtccta	agaaacctgg	gccaggccag	14280
gcgcagtggc	tcacgcctgt	aatcccagca	ctttgagaag	ccaagggtgg	cagatcacga	14340
ggtcaggagt	ttgagaccag	cctggccaac	atggtgaaac	cctgtctcta	ttaaaaatag	14400
aaaacattag	acaggtgtgg	tgggtgcatg	ctgtaatccc	agctactcag	gaggtgaggt	14460
caggagaatc	gcttgaaccc	aggaggtgga	ggttgacagt	agccgagatt	gtgccactgc	14520
actccagcct	aggcgacaga	gcaagactcc	gtctcgggaa	aattaattaa	taaataaata	14580
aacctaggtc	ccagagtccc	acagaatggc	agacaggagc	acctgggggc	ttttagggtg	14640
lygcatttcc	cctgtactaa	ctctgggctg	tccagagggc	catttcatgg	cgtggagtgg	14700
agagggaggc	agcacaggac	ttcctagccc	tcagctctca	cctgcccata	ttttgatttc	14760
caggcagtta	acatcactga	cctgagcgag	aacagaaagc	aggacaagcg	cttcgccttc	14820
atccgctcag	acagtggccc	caccaccagt	tttgagtctg	ccgctgccc	cgttggttc	14880
ctctgcacag	cgatggaagc	tgaccagccc	gtcagcctca	ccaatatgcc	tgacgaaggg	14940
gtcatgggtca	ccaaattcta	cttccaggag	gacgagtagt	actgccagg	cctgcctgtt	15000
cccattcttg	catggcaagg	actgcaggga	ctgccagtcc	ccctgcccga	gggctcccgg	15060
ctatgggggc	actgaggacc	agccattgag	gggtggaccc	tcagaaggcg	tcacaacaac	15120
ctggtcacag	gactctgcct	ctcttccaac	tgaccagcct	ccatgctgcc	tccagaatgg	15180
tctttctaata	gtgtgaaatc	gagcacagca	gcccctgcac	aaagcccttc	catgtcgcct	15240
ctgcattcag	gatcaaaacc	cgaccacctg	cccaacctgc	tctcctcttg	ccactgcctc	15300
ttcctccctc	attccacctt	cccattgcct	ggatccatca	ggccacttga	tgacccccaa	15360

Fig. 16(e)

ES 2 702 929 T3

ccaagtggct	cccacaccct	gttttacaaa	aaagaaaaga	ccagtccatg	agggagggtt	15420
ttaaggggtt	gtggaaaatg	aaaattagga	tttcatgatt	tttttttttc	agtccccgtg	15480
aaggagagcc	cttcatttgg	agattatggt	ctttcgggga	gaggctgagg	acttaaaata	15540
ttcctgcatt	tgtgaaatga	tggtgaaagt	aagtggtagc	ttttcccttc	tttttcttct	15600
ttttttgtga	tgtcccaact	tgtaaaaaatt	aaaagttatg	gtactatggt	agccccataa	15660
tttttttttt	ccttttaaaa	cacttccata	atctggactc	ctctgtccag	gcactgctgc	15720
ccagcctcca	agctccatct	ccactccaga	ttttttacag	ctgcctgcag	tactttacct	15780
cctatcagaa	gtttctcagc	tcccaaggct	ctgagcaaat	gtggctcctg	ggggttcttt	15840
cttcctctgc	tgaaggaata	aattgctcct	tgacattgta	gagcttctgg	cacttggaga	15900
cttgatgaa	agatggctgt	gcctctgcct	gtctcccca	cgggctggg	agctctgcag	15960
agcaggaaac	atgactcgta	tatgtctcag	gtccctgcag	ggccaagcac	ctagcctcgc	16020
tcttggcagg	tactcagcga	atgaatgctg	tatatgttgg	gtgcaaagtt	ccctacttcc	16080
tgtgacttca	gctctgtttt	acaataaaat	cttgaaaatg	ccta		16124

Fig. 16(f)

SEQ ID n° 4: Locus rs9005 de IL1RN

aattaggatt	tcatgatttt	tttttttcag	tccccgtgaa	ggagagccct	tcattttggag	60
attatgttct	ttcggggaga	ggctgaggac	ttaaaatatt	cctgcatttg	tgaaatgatg	120
gtgaaagtaa	gtggtagctt	ttcccttctt	tttcttcttt	ttttgtgatg	tcccaacttg	180
taaaaaattaa	aagttatggt	actatgttag	cccataaatt	ttttttttcc	ttttaaaca	240
cttcataat	ctggactcct	ctgtccaggc	actgctgccc	agcctccaag	ctccatctcc	300
actccagatt	ttttacagct	gcctgcagta	ctttacctcc	tatcagaagt	ttctcagctc	360
ccaaggctct	gagcaaatgt	ggctcctggg	ggttctttct	tcctctgctg	aaggaataaa	420
ttgctccttg	acattgtaga	gcttctggca	cttggagact	tgtatgaaag	atggctgtgc	480
ctctgctgt	ctccccacc	rggctgggag	ctctgcagag	caggaaacat	gactcgtata	540
tgtctcaggt	ccctgcaggg	ccaagcacct	agcctcgctc	ttggcaggta	ctcagcgaat	600
gaatgctgta	tatgttgggt	gcaaagtctc	ctacttcctg	tgacttcagc	tctgttttac	660
aataaaatct	tgaaaatgcc	tataattgtg	actatgtcct	tgcccttgac	aggctttggg	720
tatagagtgc	tgaggaaact	gaaagaccaa	tgtgtctttc	ttaccccaga	ggctggcgcc	780
tggcctcttc	tctgagagtt	cttttcttcc	ttcagcctca	ctctccctgg	ataacatgag	840
agcaaatctc	tctgcaaaaa	agatatggg	cagcactgtc	cacaacagcc	tctgctggaa	900
acaacccaag	cacccatcac	agaatgaatt	agtacatcat	gtatctgcac	acaacacagt	960
gctccttggc	aaagaaaatg	aatgaattac	agccagctgc	a		1001

SEQ ID n° 5: Locus rs315952 de IL1RN

tcacgaggtc	aggagtttga	gaccagcctg	gccaacatgg	tgaaaccctg	tctctattaa	60
aaatagaaaa	cattagacag	gtgtgggtgt	gcatgcctgt	aatcccagct	actcaggagg	120
ctgaggcagg	agaatcgctt	gaacccagga	ggtggagggt	gcagtgagcc	gagattgtgc	180
cactgcactc	cagcctaggc	gacagagcaa	gactccgtct	cgggaaaatt	aattaataaa	240
taaataaacc	taggtcccag	agtcccacag	aatggcagac	aggagcacct	gggggctttt	300
agggtatggc	atttcccctg	tactaaactct	gggctgtcca	gagggccatt	tcatggcgtg	360
gagtggagag	ggaggcagca	caggacttcc	taggcctcag	ctctcacctg	cccatctttt	420
gatttccagg	cagttaacat	cactgacctg	agcgagaaca	gaaagcagga	caagcgcttc	480
gccttcatcc	gctcagacag	yggccccacc	accagttttg	agtctgccgc	ctgccccggt	540
tggttcctct	gcacagcgat	ggaagctgac	cagcccgtca	gctcaccaa	tatgcctgac	600
gaaggcgctca	tggtcaccaa	attctacttc	caggaggacg	agtagtactg	cccaggcctg	660
cctgttccca	ttcttgcatg	gcaaggactg	cagggactgc	cagtccccct	gccccagggc	720
tcccggctat	gggggcactg	aggaccagcc	attgaggggt	ggaccctcag	aaggcgctac	780
aacaacctgg	tcacaggact	ctgcctcctc	ttcaactgac	cagcctccat	gctgcctcca	840
gaatgggtctt	tctaattgtg	gaatcagagc	acagcagccc	ctgcacaaag	cccttccatg	900
tcgcctctgc	attcaggatc	aaaccccagc	cacctgcccc	acctgctctc	ctcttgccac	960
tgcctcttcc	tccctcattc	caccttccca	tgcctggat	c		1001

Fig. 16(g)

SEQ ID nº 6: Región específica del locus rs9005 de IL1RN (correspondiente a los nucleótidos 415 a 466 de la SEQ ID nº 4), en donde N es A o G

<221> variación
 <222> (27) .. (27)
 <223> nes a o g
 ctgtgcctct gctgtctcc cccacnngc tgggagctct gcagagcagg aa 52

SEQ ID nº 7: Región específica del locus rs315952 de IL1RN (correspondiente a los nucleótidos 415 a 466 de la SEQ ID nº 5), en donde N es C o T

<221> variación
 <222> (27) .. (27)
 <223> nes c o t
 cgcttcgcct tcctccgctc agacagnngc cccaccacca gttttgagtc tg 52

SEQ ID nº 8: Cebador 1 de rs315952

gcttcgcctt catccgctca gacag 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)