



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 984 296**

(21) Número de solicitud: 202330245

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G16B 20/20 (2009.01)
G16H 50/30 (2008.01)



PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

(22) Fecha de presentación:

23.03.2023

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

29.10.2024

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

30.01.2025

Fecha de concesión:

19.06.2025

(45) Fecha de publicación de la concesión:

26.06.2025

(73) Titular/es:

BAIGENE, S.L. (50.00%)
Hermanos Lumiere, 11
01510 Vitoria-Gasteiz (Araba/Álava) ES y
SANTXA RESEARCH S.L.U. (50.00%)

(72) Inventor/es:

AZNAR OVIEDO, Jose María;
CELORRIO HERRERA, David;
GARCÍA FERNÁNDEZ, Saínza;
GIMENO LLUCH, Irene;
JORQUERA CUEVAS, Cristina;
SÁNCHEZ ARIZMENDIARRIETA, Pello;
BEITIA SAN VICENTE, Maider;
DELGADO SAN VICENTE, Diego y
SÁNCHEZ ÁLVAREZ, Mikel

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico

(54) Título: **Método de obtención de datos útiles para la predicción de la respuesta de un sujeto al tratamiento con Plasma Rico en Plaquetas**

(57) Resumen:

Método de obtención de datos útiles para la predicción de la respuesta de un sujeto al tratamiento con Plasma Rico en Plaquetas.

La presente invención se relaciona con un método in vitro de obtención de datos útiles para calcular la probabilidad de un sujeto de responder positivamente al tratamiento con Plasma Rico en Plaquetas (PRP), que comprende el análisis de una serie de polimorfismos genéticos junto con una variable ambiental característica del sujeto. La presente invención también se relaciona con un kit que comprende los medios necesarios para detectar los polimorfismos genéticos y el uso de dicho kit en el método in vitro antes mencionado.

ES 2 984 296 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.

Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

Método de obtención de datos útiles para la predicción de la respuesta de un sujeto al tratamiento con Plasma Rico en Plaquetas

5

La presente invención se relaciona con un método *in vitro* de obtención de datos útiles para el cálculo de la probabilidad de un sujeto de responder positivamente al tratamiento con Plasma Rico en Plaquetas (PRP), encuadrándose dentro del campo de la Medicina Personalizada. En concreto, dicho método, se basa en el análisis de una serie de 10 polimorfismos genéticos, así como otros datos de carácter ambiental del sujeto, que conjuntamente son útiles y permiten la predicción de la respuesta al tratamiento con PRP.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15

El PRP se define como un volumen de plasma autólogo que contiene una concentración de plaquetas superior al nivel basal. Es una terapia biológica y autóloga que usa el propio plasma del paciente y los factores de crecimiento y otras biomoléculas derivados de las plaquetas con propósitos regenerativos. Estas actúan sobre los tejidos influyendo 20 en diferentes procesos biológicos. Así, ayudan a favorecer la reparación y regeneración de los tejidos y estructuras diana gracias a efectos moduladores sobre la inflamación o la modulación celular entre otros. Estas propiedades contribuyen a fomentar un ambiente biológico apropiado para fomentar procesos reparadores.

25 Durante los últimos años se ha extendido el uso del PRP en diversas especialidades médicas como la dermatología, la medicina estética y la odontología, entre otras, siendo las patologías musculoesqueléticas donde más implantado está el uso del PRP. Estas patologías se definen como las lesiones que afectan al aparato locomotor (músculos, tendones, huesos, nervios, ligamentos, cartílago y otras estructuras próximas a las 30 articulaciones). Su origen suele ser debido al resultado de un mal uso o por la acción de determinados factores de forma continuada, provocando por lo general patologías crónicas que afectan sobre todo a las articulaciones.

Tanto en España como en la Unión Europea, son el problema de salud laboral más 35 frecuente y representan una de las principales causas de absentismo laboral. Estas patologías se han incrementado de manera exponencial en los últimos años, afectando

a gran parte de la población. Debido al incremento de la esperanza de vida en la sociedad actual, las patologías musculoesqueléticas se han convertido en una de las principales causas de invalidez y dolor crónico. El impacto económico que suponen en la sociedad es considerable representando del 0,5 al 2 % de PIB.

5

Los tratamientos actuales para este tipo de patologías se pueden dividir en tratamientos conservadores e intervenciones quirúrgicas. Los primeros van desde tratamientos fisioterápicos hasta terapia farmacológica, ya sea oral como antiinflamatorios y analgésicos, hasta infiltraciones cortico-anestésicas o de ácido hialurónico dependiendo 10 de la patología. Sin embargo, estos tratamientos están enfocados en el alivio de los síntomas, pero no en reparar el daño provocado o en enlentecer la degeneración. Cuando estos tratamientos no resultan eficaces, la única solución para estos pacientes es la cirugía con los riesgos e inconvenientes que ello implica. Los principales actos quirúrgicos resultantes de estas patologías son la colocación de prótesis de cadera o 15 rodilla (artroplastias), que se realizan cuando el nivel de degeneración articular es irreparable con tratamientos conservadores.

Desde hace varios años la medicina regenerativa ha irrumpido en el ámbito médico para el tratamiento de las patologías del sistema musculoesquelético. Este tipo de 20 terapia pretende ser una alternativa a pacientes susceptibles de intervenir quirúrgicamente que no han respondido a los tratamientos convencionales. Es decir, un paso intermedio entre los tratamientos conservadores y la cirugía, siendo el PRP la técnica más representativa en este ámbito y que ya se ha definido anteriormente. Los resultados clínicos obtenidos con esta terapia son muy positivos y prometedores, con 25 una gran recuperación y satisfacción de los pacientes, aunque aún existe un amplio margen de mejora en la aplicación del PRP ya que hay varios factores que influyen en la eficacia del PRP como el producto o el protocolo de aplicación.

Sin embargo, una de las variables que más puede influir en el resultado clínico del 30 tratamiento son las características biológicas del paciente, las cuales pueden determinar tanto la composición molecular del PRP como la expresión de los receptores celulares los cuales determinan la respuesta celular a los productos biológicos, y una expresión defectuosa podría limitar la eficacia del tratamiento. Tanto la síntesis de las moléculas del PRP como la síntesis y expresión de los receptores está condicionada por base 35 genética del paciente. Conocer tanto los genes implicados como la dotación genética adecuada ayudaría no sólo a predecir la respuesta del PRP sino también optimizar el

tratamiento.

En este sentido, queda patente como la propia variabilidad individual es un factor clave a la hora de obtener una mayor o menor respuesta al tratamiento. En esta variabilidad 5 interindividual recientes estudios han mostrado cómo los polimorfismos genéticos presentes en genes responsables de la síntesis de estos propios factores pueden estar influyendo en la expresión y concentración de los mismos. Estudios realizados en cáncer, terapias en enfermedades del sistema cardiovascular y en otras enfermedades han reportado información que involucra directamente a las diferentes dotaciones 10 genéticas con la variabilidad en respuesta entre individuos. Concretamente en medicina regenerativa se han descubierto diferentes posiciones polimórficas como posibles factores diferenciadores.

Se han descrito diversos métodos que tienen relación con la extracción composición y 15 formas y/o medios de utilización PRP. De la misma forma se han asociado los polimorfismos genéticos con diferente expresión o concentración en plasma de los componentes del mismo. De la misma forma, recientemente se ha publicado Szyluk K, et al. 2022, J Clin Med., 11(21):6362. doi: 10.3390/jcm11216362. PMID: 36362590) la asociación de diferentes polimorfismos en el gen PDGFBR con la respuesta al 20 tratamiento con PRP en patologías deportivas.

Sin embargo, los métodos descritos en el estado de la técnica no permiten predecir de forma fiable el riesgo de un sujeto a no responder a un tratamiento con PRP. Así, a la 25 luz de los descrito anteriormente, es necesario disponer de métodos que tengan utilidad pronóstica de la respuesta de un paciente al PRP.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención divulga un método de obtención de datos útiles *in vitro* para 30 calcular la probabilidad de un sujeto a responder positivamente al tratamiento con PRP.

Para el desarrollo del mismo, los inventores se basaron en la utilización de la variable ambiental rango de edad junto con variables genéticas que comprenden el análisis de uno o varios polimorfismos genéticos de los genes GH1, SOD2, UCP2, GCKR, así como 35 sus combinaciones con polimorfismos de los genes IGFR-1, VEGFR2, ADRB2. La aplicación de un algoritmo que tiene en cuenta las variables anteriores, ambientales y

genéticas, permite obtener un valor del riesgo de un sujeto a responder positivamente al tratamiento con PRP.

El algoritmo de la presente invención tiene en cuenta variables genéticas y ambientales 5 de forma conjunta que permiten calcular un valor de probabilidad específica de cada sujeto.

Los inventores han observado que la aplicación de esta aproximación en pacientes tiene una sensibilidad y especificidad elevadas, teniendo el método de la invención buena 10 capacidad predictiva, tal y como muestran los análisis de curvas COR (o Curvas ROC por sus siglas en inglés *Receiver Operating Characteristic*) (Figura 1; Tablas 7, 8 y 9).

La presente invención provee así una aproximación innovadora en el área de la medicina personalizada con múltiples ventajas asociadas: permite obtener datos de 15 utilidad para conocer la probabilidad de un paciente a responder al tratamiento con PRP con una sensibilidad y especificidad elevada; permite tomar decisiones previas al tratamiento como evitar dicho tratamiento a pacientes que han resultado tener baja probabilidad de éxito tras la aplicación de la presente invención y optar por otras opciones terapéuticas. Además, también puede tener utilidad a la hora de potenciar el 20 tratamiento del PRP para tratar de incrementar las posibilidades de éxito del tratamiento haciendo hincapié en otras variables relacionadas. Asimismo, permite conocer la probabilidad de un paciente a responder positivamente al tratamiento con PRP previamente a recibarlo.

25 Método de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* de obtención de datos útiles para calcular la probabilidad de un sujeto a responder positivamente al tratamiento con PRP, de aquí en adelante “el método de la invención”, que comprende 30 las siguientes etapas:

(a) analizar en una muestra biológica aislada del sujeto, al menos, un polimorfismo genético seleccionado de la lista que consiste en rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2, y rs1260326 del gen GCKR, en donde cada uno 35 de dichos polimorfismos puede reemplazarse por otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él;

(b) recoger la variable ambiental 'edad' del sujeto,

(c) asignar un valor β a los polimorfismos genéticos analizados en la etapa (a) según la

5 Tabla 2, y asignar un valor β a la variable ambiental recogida del sujeto en la etapa (b) según la Tabla 2; y

(d) calcular un valor P de probabilidad de un sujeto a responder positivamente al tratamiento con PRP, mediante la aplicación del algoritmo:

10

$$P = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 x)}}$$

en donde,

β_0 es 0,662

$\beta_1 x$ es la suma de todos los valores β asignados en la etapa (c).

15

Tal como se usa en la presente invención, el término "*in vitro*" se refiere a que el método de la invención se realiza fuera del cuerpo del sujeto.

En el contexto de la presente invención, el término "Plasma Rico en Plaquetas" o "PRP"

20 se refiere a cualquier preparación de plasma que presenta una concentración similar o más alta de plaquetas que la muestra de sangre a partir de la que se ha derivado el plasma, así como a las preparaciones de suero y otros derivados tanto del PRP como de la sangre completa.

25 Estos productos se emplean en el tratamiento de patologías que requieren reparación tisular debido sus características biológicas que les confieren un gran potencial terapéutico. Los procesos que desencadenan las biomoléculas efectoras contenidas en estos productos favorecen la reparación y regeneración del tejido diana, así como la mejora sintomática del paciente. La eficacia del PRP y de sus productos derivados 30 dependen de factores como el tipo de producto, el protocolo de aplicación o las características biológicas del paciente. Debido a esto, hay pacientes que ya tienen una predisposición natural a responder positivamente o no al tratamiento con este tipo de productos.

- En la presente invención, la frase "calcular la probabilidad de un sujeto de responder positivamente al tratamiento con PRP", se refiere a estimar o inferir la probabilidad de un sujeto a mejorar sintomatológicamente de su condición patológica tras el tratamiento con PRP. Evaluar si la condición patológica de un sujeto mejora sintomatológicamente
- 5 es práctica de rutina para el experto en la materia. En la presente invención, la obtención de datos útiles para calcular dicha probabilidad comprende la aplicación de un algoritmo que tiene en cuenta tanto la variable ambiental 'edad' como las variables genéticas, en particular, polimorfismos genéticos, del sujeto.
- 10 En la presente invención el algoritmo del método de la invención se considera predictivo cuando la AUCROC (AUC-Area UnderCurve o área bajo la curva; ROC-*Receiver Operating Characteristic* o característica operativa del receptor) es mayor de 0,5. El AUCROC se define como la probabilidad de clasificar correctamente un par de individuos caso y control, seleccionados al azar de la población, mediante los resultados 15 o valores obtenidos al aplicarles el algoritmo.
- El AUCROC por convenio está comprendido entre 0,5 y 1: cuanto más cercano a 1 es el valor AUCROC de una variable, más preciso y predictivo se considera. La sensibilidad de la prueba diagnóstica es la probabilidad de obtener un resultado positivo cuando el 20 individuo responde positivamente a la intervención, en la presente invención, respuesta positiva al tratamiento con PRP. La especificidad de una prueba indica la probabilidad de obtener un resultado negativo cuando el individuo no responde positivamente a la intervención, en la presente invención, la aplicación del PRP.
- 25 El término "sujeto" en la presente invención se refiere a cualquier individuo susceptible de recibir la aplicación del PRP, o a cualquier individuo del que se tenga interés en conocer la probabilidad de respuesta positiva tras someterse a dicha intervención. Los términos "paciente" o "sujeto" se usan en la presente invención de forma indistinta. Entre 30 los ejemplos de "sujetos" o "pacientes" se incluyen, sin limitarse a, mamíferos, preferiblemente, animales domésticos y de granja (tales como vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos, roedores, etc.), primates no-humanos y humanos, más preferiblemente, un ser humano de cualquier sexo o edad.
- En la presente invención, la respuesta al tratamiento con PRP puede darse tras su 35 administración en cualquier órgano o tejido del sujeto para tratar cualquier patología que requiera la acción sobre un tejido diana. Preferiblemente, patologías

musculoesqueléticas. Más preferiblemente, en patologías musculoesqueléticas que conlleven la degeneración articular.

La administración del PRP puede llevarse a cabo por cualquiera de los métodos 5 conocidos en el estado de la técnica, tales como, parenteral, subcutánea, intraarticular, intraósea, intrameniscal, intratendinosa, peritendinosa, intraligamentosa, intramuscular, intraneuronal o perineural, entre otras.

Así, en una realización preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones 10 preferidas, el sujeto va a ser sometido a un tratamiento de PRP. En otra realización más preferida, la administración del PRP al sujeto se realiza en una articulación. Ejemplos de articulaciones, incluyen, sin limitar a, rodilla, tobillo, cadera, hombro y codo. Así, en otra realización aún más preferida, la articulación es seleccionada de la lista que consiste en rodilla, tobillo, cadera, hombro y codo.

15

Etapa (a) del método de la invención: análisis de los polimorfismos genéticos

Una primera etapa del método de la invención [etapa (a)] comprende analizar en una muestra biológica aislada del sujeto, al menos, un polimorfismo genético seleccionado de la lista que consiste en rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del 20 gen UCP2, y rs1260326 del gen GCKR, en donde cada uno de dichos polimorfismos puede reemplazarse por otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él.

Tal como se usa en la presente invención, el término "polimorfismo genético" se refiere 25 a una variación en la secuencia de nucleótidos de la cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) que tiene al menos una frecuencia del 1% en los individuos de una población. Los polimorfismos genéticos pueden ser variaciones de uno o varios nucleótidos. Los polimorfismos de un solo nucleótido, "*single nucleotide polymorphism*" o SNP, generalmente dan lugar a dos alelos.

30

Los términos "polinucleótido", "secuencia nucleotídica", "secuencia de nucleótidos", "ácido nucleico" y "oligonucleótido" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, que pueden estar, o no, química o bioquímicamente modificados.

35

En la presente invención, el término “analizar” referido a “polimorfismo/s” genético/s”, se refiere a detectar dicho polimorfismo/s, determinando su genotíp o genotípos.

El polimorfismo genético rs2665802 del gen GH1, se refiere a un SNP situado en la 5 posición 63917670 del cromosoma 17 de homo sapiens (número de acceso al GenBank de la secuencia del cromosoma 17 de homo sapiens: NC_000017.11:63917669). Los genotípos pueden ser homocigoto para adenina (A:A), heterocigoto adenina:timina (A:T) u homocigoto para timina (T:T).

10 El polimorfismo genético rs4880 del gen SOD2, se refiere a un SNP situado en la posición 159692840 del cromosoma 6 de homo sapiens (número de acceso al GenBank de la secuencia del cromosoma 6 de homo sapiens: NC_000006.12:159692839). Los genotípos pueden ser homocigoto para adenina (A:A), heterocigoto adenina:guanina (A:G) u homocigoto para guanina (G:G).

15 El polimorfismo genético rs660339 del gen UCP2, se refiere a un SNP situado en la posición 73978059 del cromosoma 11 de homo sapiens (número de acceso al GenBank de la secuencia del cromosoma 11 de homo sapiens: NC_000011.10:73978058). Los genotípos pueden ser homocigoto para adenina (A:A), heterocigoto adenina:guanina 20 (A:G) u homocigoto para guanina (G:G).

El polimorfismo genético rs1260326 del gen GCKR, se refiere a un SNP situado en la 25 posición 27508073 del cromosoma 2 de homo sapiens (número de acceso al GenBank de la secuencia del cromosoma 11 de homo sapiens: NC_000002.12:27508072). Los genotípos pueden ser homocigoto para citosina (C:C), heterocigoto: citosina:timina (C:T) u homocigoto para timina (T:T).

En una realización preferida del método de la invención, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas anteriores del método de la invención, la etapa (a) 30 comprende analizar, al menos, dos polimorfismos genéticos seleccionados de la lista que consiste en rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2, y rs1260326 del gen GCKR, en donde cada uno de dichos polimorfismos puede reemplazarse por otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él.

35

En una realización más preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la etapa (a) comprende analizar el polimorfismo genético rs2665802 del gen GH1 y el polimorfismo genético rs4880 del gen SOD2.

5 En otra realización más preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la etapa (a) comprende analizar el polimorfismo genético rs2665802 del gen GH1 y el polimorfismo genético rs660339 del gen UCP2.

10 En otra realización más preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la etapa (a) comprende analizar el polimorfismo genético rs2665802 del gen GH1 y el polimorfismo genético rs1260326 del gen GCKR.

15 En una realización más preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la etapa (a) comprende analizar el polimorfismo genético rs4880 del gen SOD2 y el polimorfismo genético rs660339 del gen UCP2.

En una realización más preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la etapa (a) comprende analizar el polimorfismo genético rs4880 del gen SOD2 y el polimorfismo genético rs1260326 del gen GCKR.

20

En una realización más preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la etapa (a) comprende analizar el polimorfismo genético rs660339 del gen UCP2 y el polimorfismo genético rs1260326 del gen GCKR.

25 En otra realización preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la etapa (a) comprende analizar, al menos, tres polimorfismos genéticos que consisten en el polimorfismo rs2665802 del gen GH1 y dos seleccionados de la lista que consiste en el polimorfismo rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2, y rs1260326 del gen GCKR, en donde cada uno de dichos polimorfismos puede reemplazarse por 30 otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él.

En otra realización preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la etapa (a) comprende analizar, al menos, tres polimorfismos genéticos seleccionados de la lista que consiste rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, 35 rs660339 del gen UCP2, y rs1260326 del gen GCKR, en donde cada uno de dichos

polimorfismos puede reemplazarse por otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él.

En otra realización más preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la etapa (a) comprende analizar cuatro polimorfismos genéticos seleccionados de la lista que consiste en rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2, y rs1260326 del gen GCKR, en donde cada uno de dichos polimorfismos puede reemplazarse por otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él. Aún más preferiblemente, los polimorfismos genéticos consisten en el rs2665802 del gen GH1, el rs4880 del gen SOD2, el rs660339 del gen UCP2, y el rs1260326 del gen GCKR.

Además del análisis de, al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, de los polimorfismos genéticos seleccionados de la lista que consiste en el polimorfismo rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2, y rs1260326 del gen GCKR, en donde cada uno de dichos polimorfismos puede reemplazarse por otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él, en particular, además del análisis de los polimorfismos genéticos rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2, y rs1260326 del gen GCKR, la etapa (a) del método de la invención puede comprender analizar, al menos, un polimorfismo genético seleccionado de la lista que consiste en el polimorfismo rs2229765 del gen IGFR-1, rs1870377 del gen VEGFR2, y rs1042714 del gen ADRB2, en donde cada uno de dichos polimorfismos puede reemplazarse por otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él.

25

El polimorfismo genético rs2229765 del gen IGFR-1, se refiere a un SNP situado en la posición 98934996 del cromosoma 15 de homo sapiens (número de acceso al GenBank de la secuencia del cromosoma 15 de homo sapiens: NC_000015.10:98934995). Los genotipos pueden ser homocigoto para adenina (A:A), heterocigoto adenina:guanina (A:G) u homocigoto para guanina (G:G).

El polimorfismo genético rs1870377 del gen VEGFR2, se refiere a un SNP situado en la posición 55106807 del cromosoma 4 de homo sapiens (número de acceso al GenBank de la secuencia del cromosoma 4 de homo sapiens: NC_000004.12:55106806). Los genotipos pueden ser homocigoto para adenina (A:A), heterocigoto adenina:timina (A:T) u homocigoto para timina (T:T).

El polimorfismo genético rs1042714 del gen ADRB2, se refiere a un SNP situado en la posición 148826910 del cromosoma 5 de homo sapiens (número de acceso al GenBank de la secuencia del cromosoma 5 de homo sapiens: NC_000005.10:148826909). Los 5 genotipos pueden ser homocigoto para citosina (C:C), heterocigoto citosina:guanina (C:G) u homocigoto para guanina (G:G).

- Así, en una realización preferida del método de la invención, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la etapa (a) comprende analizar, además, al menos, 10 un polimorfismo genético seleccionado de la lista que consiste en el polimorfismo rs2229765 del gen IGFR-1, el rs1870377 del gen VEGFR2, y el rs1042714 del gen ADRB2, en donde cada uno de dichos polimorfismos puede reemplazarse por otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él.
- 15 En otra realización preferida del método de la invención, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la etapa (a) además comprende analizar, al menos dos, al menos tres, polimorfismos genéticos seleccionados de la lista que consiste en el polimorfismo rs2229765 del gen IGFR-1, el rs1870377 del gen VEGFR2, y el rs1042714 del gen ADRB2, en donde cada uno de dichos polimorfismos puede reemplazarse por 20 otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él.

En otra realización preferida del método de la invención, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la etapa (a) comprende analizar, al menos, siete polimorfismos genéticos seleccionados de lista que consiste en rs2229765 del gen 25 IGFR-1, rs1870377 del gen VEGFR2, rs1042714 del gen ADRB2, rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2, y rs1260326 del gen GCKR, en donde cada uno de dichos polimorfismos puede reemplazarse por otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él, incluyendo cualquier combinación de los mismos.

30 En otra realización más preferida del método de la invención, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la etapa (a) comprende analizar los polimorfismos genéticos rs2229765 del gen IGFR-1, rs1870377 del gen VEGFR2, rs1042714 del gen ADRB2, rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2, 35 rs1260326 del gen GCKR.

En el presente documento se emplea la frase "polimorfismos de la invención" para referirse a, al menos, un polimorfismo genético seleccionado de entre los polimorfismos rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2, y rs1260326 del gen GCKR, en donde cada uno de dichos polimorfismos puede reemplazarse por 5 otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él, y/o a cualquier combinación de uno o más de los polimorfismos genéticos anteriores con, al menos, un polimorfismo genético seleccionado de entre rs2229765 del gen IGFR-1, rs1870377 del gen VEGFR2, y rs1042714 del gen ADRB2, en donde cada uno de dichos polimorfismos puede reemplazarse por otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de 10 ligamiento con él.

En la presente invención, los polimorfismos genéticos son SNPs, por lo que los términos "polimorfismos de la invención" y "SNPs de la invención" pueden usarse indistintamente a lo largo del documento.

15

En la tabla 1 se muestran algunos de los polimorfismos genéticos que pueden ser incluidos como variables genotípicas dentro del método de la invención.

Gen	Polimorfismo	Genotipos	Localización
IGFR-1	rs2229765	A:A	Cromosoma 15:98934996 NC_000015.10:g.98934996G>A
		A:G	
		G:G	
VEGFR2	rs1870377	A:A	Cromosoma 4:55106807 NC_000004.12:g.55106807T>A
		A:T	
		T:T	
ADRB2	rs1042714	C:C	Cromosoma 5:148826910 NC_000005.10:g.148826910G>C
		C:G	
		G:G	
GH1	rs2665802	A:A	Cromosoma 17:63917670 NC_000017.11:g.63917670A>T
		A:T	
		T:T	
SOD2	rs4880	A:A	Cromosoma 6:159692840 NC_000006.12:g.159692840A>G
		A:G	

		G:G	
UCP2	rs660339	A:A	Cromosoma 11:73978059 NC_000011.10:g.73978059G>A
		A:G	
		G:G	
GCKR	rs1260326	C:C	Cromosoma 2:27508073 NC_000002.12:g.27508073T>C
		C:T	
		T:T	

Tal como se ha indicado en la presente invención, cada uno de dichos polimorfismos puede reemplazarse por otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él.

5

El término "desequilibrio de ligamiento", se refiere a la propiedad de algunos genes o marcadores de ADN de no segregar de forma independiente, es decir, poseen una frecuencia de recombinación menor del 50%. Esto suele deberse a que los dos loci implicados se encuentran en el mismo cromosoma, lo que imposibilita su transferencia a la progenie de manera aleatoria con la separación de los cromosomas en anafase. En la presente invención, se refiere a aquellos polimorfismos genéticos que, debido a su cercanía física en un cromosoma, se presentan juntos de manera más frecuente de lo que se esperaría por azar. Un polimorfismo genético que se encuentren en desequilibrio de ligamiento con otro presenta la misma capacidad o da una información equivalente, en la presente invención, relativa a la predicción de la probabilidad de un sujeto de responder positivamente al tratamiento con PRP, ya que por la propia definición, ambos se heredan en conjunto.

Una medida del desequilibrio de ligamiento entre dos marcadores genéticos se define como "r²". Dos polimorfismos genéticos que no han sido separados por recombinación (desequilibrio de ligamiento total), muestran un r²=1. En la presente invención, los polimorfismos que se encuentran en desequilibrio de ligamiento con los polimorfismos genéticos rs2229765 del gen IGFR-1, rs1870377 del gen VEGFR2, rs1042714 del gen ADRB2, rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2, rs1260326 del gen GCKR, preferiblemente presentan una medida de desequilibrio de ligamiento r² ≥ 0,8, más preferiblemente una medida de desequilibrio de ligamiento r² ≥

0,9. El cálculo del desequilibrio de ligamiento es práctica de rutina para el experto en la materia.

El análisis de los polimorfismos de la invención se puede realizar por cualquier método conocido por el experto en la materia para tal fin. Por ejemplo, se puede realizar mediante kits de genotipado, secuenciación o mediante amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y posterior análisis con enzimas de restricción o mediante PCR a tiempo real. Los kits de genotipado pueden contener oligonucleótidos marcados con fluoróforos y puede requerir la hibridación de estos con una muestra biológica aislada de un sujeto.

Así, en el método de la invención, el análisis de los polimorfismos de la invención de la etapa (a) se lleva a cabo por cualquier método conocido por el experto en la materia para tal fin. En una realización preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, se lleva a cabo mediante amplificación, más preferiblemente, amplificación PCR, y/o secuenciación.

En otra realización preferida del método de la invención, el análisis de los polimorfismos de la invención de la etapa (a), se lleva a cabo usando un kit de genotipado.

En otra realización preferida del método de la invención, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, el análisis de los polimorfismos de la invención de la etapa (a) comprende el empleo de sondas y/o cebadores que detectan y/o amplifican de forma específica dichos polimorfismos.

En una realización más preferida, los cebadores y/o sondas comprenden, o consisten en, las secuencias de nucleótidos: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, y/o cualquier combinación de ellos.

SEQ ID NO: 1

ACAGTGAACGAGGCCGCA

SEQ ID NO: 2

GACAATTGAACTCCTTCATCACAGA

Las secuencias SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO: 2, corresponden a las secuencias de los cebadores específicos para amplificar el polimorfismo rs2229765 del gen IGFR-1.

5

SEQ ID NO: 3

AGCTTCGTTGAGAAACTCAATCCTT

SEQ ID NO: 4

GCTTCGTTGAGAAACTCAATCCTC

10

Las secuencias SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO: 4 corresponden a las secuencias de las sondas específicas para detectar de forma específica el polimorfismo rs2229765 del gen IGFR-1.

15 SEQ ID NO: 5

TGCGCTGTTATCTCTTCTTATAGCCA

SEQ ID NO: 6

CTCCACACTCTCCATTCTTCAC

20 Las secuencias SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO: 6, corresponden a las secuencias de los cebadores específicos para amplificar el polimorfismo rs1870377 del gen VEGFR2.

SEQ ID NO: 7

GGGTTTGTCACTGAGACAGCA

25 SEQ ID NO: 8

GGGTTTGTCACTGAGACAGCT

Las secuencias SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO: 8 corresponden a las secuencias de las sondas específicas para detectar de forma específica el polimorfismo rs1870377 del gen

30 VEGFR2.

SEQ ID NO: 9

GAAGCCATGCGCCGGAC

SEQ ID NO: 10

35 GACGATGCCCATGCC

Las secuencias SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO: 10, corresponden a las secuencias de los cebadores específicos para amplificar el polimorfismo rs1042714 del gen ADRB2.

SEQ ID NO: 11

5 CCCACACCTCGTCCCTTG

SEQ ID NO: 12

CCCACACCTCGTCCCTTC

Las secuencias SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO: 12 corresponden a las secuencias de las 10 sondas específicas para detectar de forma específica el polimorfismo rs1042714 del gen ADRB2.

SEQ ID NO: 13

TGAGTTCTCTGGGTCAAGGGC

15 SEQ ID NO: 14

CCCACTGACTTGAGAGCTG

Las secuencias SEQ ID NO:13 y SEQ ID NO: 14, corresponden a las secuencias de los cebadores específicos para amplificar el polimorfismo rs2665802 del gen GH1.

20

SEQ ID NO: 15

TGCTGCCCTCTTTTAGCAGT

SEQ ID NO: 16

TGCTGCCCTCTTTAGCAGA

25

Las secuencias SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO: 16 corresponden a las secuencias de las sondas específicas para detectar de forma específica el polimorfismo rs2665802 del gen GH1.

30 SEQ ID NO: 17

CTGTGCTTCTCGTCTCAGCA

SEQ ID NO: 18

GGCTGTGCTTCTGCCTG

35 Las secuencias SEQ ID NO:17 y SEQ ID NO: 18, corresponden a las secuencias de los cebadores específicos para amplificar el polimorfismo rs4880 del gen SOD2.

SEQ ID NO: 19

GGAGCCCAGATAACCCCAAAG

SEQ ID NO: 20

5 GGAGCCCAGATAACCCAAAAA

Las secuencias SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO: 20 corresponden a las secuencias de las sondas específicas para detectar de forma específica el polimorfismo rs4880 del gen SOD2.

10

SEQ ID NO: 21

GGTCAGAATGGTGCCCCATCAC

SEQ ID NO: 22

CAGATCCAAGGAGAAAGTCAGG

15

Las secuencias SEQ ID NO:21 y SEQ ID NO: 22, corresponden a las secuencias de los cebadores específicos para amplificar el polimorfismo rs660339 del gen UCP2.

SEQ ID NO: 23

20 CAGTGCGCGCTACAGC

SEQ ID NO: 24

CCAGTGCGCGCTACAGT

25 Las secuencias SEQ ID NO:23 y SEQ ID NO: 24 corresponden a las secuencias de las sondas específicas para detectar de forma específica el polimorfismo rs660339 del gen UCP2.

SEQ ID NO: 25

GGGTCCCTTGTCACGGCT

30 SEQ ID NO: 26

ACTTATTCTGTTAGAAATATCTAGAAAACACTACGACCT

Las secuencias SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO: 26, corresponden a las secuencias de los cebadores específicos para amplificar el polimorfismo rs1260326 del gen GCKR.

35

SEQ ID NO: 27

TCTCCTAACAAACTGTTCACATCTTTTT

SEQ ID NO: 28

TCTCCTAACAAACTGTTCACATCTTTTC

- 5 Las secuencias SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO: 28 corresponden a las secuencias de las sondas específicas para detectar de forma específica el polimorfismo rs1260326 del gen GCKR.

10 En una realización más preferida del método de la invención, el análisis de los polimorfismos llevado a cabo en la etapa (a) comprende empleo de sondas que detectan los polimorfismos de la invención. Preferiblemente, las sondas que detectan dichos polimorfismos se seleccionan de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, y cualquier combinación de ellos.

15 En otra realización preferida del método de la invención, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, el análisis de los polimorfismos de la invención de la etapa (a) comprende el empleo de sondas marcadas con fluoróforos. Ejemplos de 20 fluoróforos incluyen, sin limitarse a, Alexa fluor, GFP (de sus siglas en inglés *Green Fluorescent Protein*), cerulean, mCherry, FITC, ICG, Cy-5, rodamina 800, 5-TAMRA, y azul metileno.

25 El término “secuenciación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la determinación de los nucleótidos de un ácido nucleico molde y de su orden.

30 El término “amplificación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al aumento del número de copias de un ácido nucleico molde, donde ésta puede ser realizada utilizando sondas fluorescentes. En una realización preferida del método de la invención, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la amplificación tiene lugar mediante PCR a tiempo real.

35 El término “ácido nucleico molde” o “molde”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una molécula de ácido nucleico de cadena simple o de doble cadena que va a ser amplificada o secuenciada.

El aumento del número de copias de un ácido nucleico molde se realiza por síntesis de ADN complementario mediante unas condiciones que lo permitan. Las condiciones que permitan la síntesis de ADN complementario se refiere a las condiciones en las que puede tener lugar la incorporación de los nucleótidos a un ADN naciente mediante complementariedad de bases con el ácido nucleico molde.

Las condiciones en las cuáles se realiza la secuenciación o la amplificación generalmente incluyen (a) poner en contacto un ácido nucleico molde con una polimerasa en una mezcla que además comprende un cebador, un catión bivalente, (por ejemplo, Mg²⁺), y nucleótidos, generalmente, dNTPs y, al menos, un ddNTP, y (b) someter dicha mezcla a una temperatura suficiente para que la polimerasa inicie la incorporación de los nucleótidos al cebador mediante complementariedad de bases con el ácido nucleico molde, y de lugar a una población de moléculas de ADN complementario de diferente tamaño. La separación de dicha población de moléculas de ADN complementario, generalmente, mediante electroforesis, permite determinar la secuencia de nucleótidos.

El término "cebador", como se utiliza aquí, se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN cuando hibrida con el ácido nucleico molde. Preferiblemente, el cebador es un oligonucleótido de desoxirribosa. Los cebadores pueden prepararse mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse a, la clonación y restricción de secuencias apropiadas y la síntesis química directa. Los cebadores pueden diseñarse para hibridar con secuencias específicas de nucleótidos en el ácido nucleico molde (cebadores específicos) o pueden ser sintetizados al azar (cebadores arbitrarios).

El término "cebador específico", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un cebador cuya secuencia es complementaria a una secuencia específica de nucleótidos en el ácido nucleico molde que se quiere amplificar o secuenciar.

30 El término "cebador arbitrario" se refiere a un cebador cuya secuencia es sintetizada al azar y que se usa para iniciar la síntesis del ADN en posiciones aleatorias del ácido nucleico molde que se quiere amplificar o secuenciar. Con frecuencia se emplea una población de distintos cebadores arbitrarios. El término "cebadores arbitrarios" se refiere a un conjunto de cebadores cuya secuencia es sintetizada al azar y que se usa para iniciar la síntesis del ADN en posiciones aleatorias del ácido nucleico molde que se quiere amplificar o secuenciar.

El término "hibridación", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al apareamiento de dos moléculas de ADN de cadena simple complementarias para dar una molécula de doble cadena. Preferiblemente, la complementariedad es del 100%.

5 Esto es, en la región de complementariedad cada nucleótido de una de las dos moléculas de ácido nucleico puede formar enlaces de hidrógeno con un nucleótido presente en la otra molécula de ácido nucleico. Sin embargo, aquéllos con una experiencia normal en el campo reconocerán que dos moléculas de ácido nucleico que posean una región con complementariedad menor al 100% también pueden hibridar.

10

El término "nucleótido", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una molécula orgánica formada por la unión covalente de una pentosa, una base nitrogenada y un grupo fosfato. El término nucleótido incluye desoxirribonucleósidos trifosfato como, por ejemplo, pero sin limitarse, dATP, dCTP, dITP, dUTP, dGTP, dTTP, 15 o derivados de los mismos. El término nucleótido incluye también dideoxirribonucleósidos trifosfato (ddNTPs), como por ejemplo, ddATP, ddCTP, ddGTP, ddITP, ddTTP o derivados de los mismos.

20

De acuerdo con la presente invención, un "nucleótido" o un "cebador" puede ser marcado o etiquetado mediante técnicas bien conocidas en el estado de la técnica. Etiquetas detectables incluyen, sin limitarse a, isótopos radiactivos, etiquetas fluorescentes, etiquetas quimioluminiscentes, etiquetas bioluminiscentes y etiquetas enzimáticas.

25

El término "muestra biológica" en la presente invención se refiere a cualquier muestra que permita obtener ADN del individuo del que se ha obtenido dicha muestra, e incluye, pero sin limitarse a, tejidos y/o fluidos biológicos de un individuo obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin.

30

Así, en una realización preferida del método de la invención, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la muestra biológica procede de cualquier tejido susceptible de una extracción de ADN. La muestra biológica podría ser, por ejemplo, pero sin limitarse a, un tejido o una muestra de fluido, como sangre, plasma, suero, mucosa oral, lavado broncoalveolar, linfa o fluido ascítico. En una realización más preferida, la muestra biológica es seleccionada de la lista que consiste en tejido, mucosa

oral, sangre, plasma, suero y linfa. Asimismo, la muestra biológica puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse a, fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina.

Etapa (b) del método de la invención: Recoger datos del sujeto

5 Como se ha explicado previamente en la presente descripción, el algoritmo empleado en el método de la invención que permite calcular la probabilidad de un sujeto de responder positivamente al tratamiento con PRP, se basa en la utilización de variables genómicas junto con variables ambientales de cada sujeto. Para ello, por tanto, es necesario recoger datos relativos a dichas variables ambientales del sujeto.

10

Así, una segunda etapa del método de la invención [etapa (b)] comprende recoger la variable ambiental 'edad' del sujeto.

15 En la presente invención, se entiende por "variable ambiental del sujeto" a los datos clínicos o fisiológicos que presenta un sujeto más allá de sus datos genéticos. Ejemplos de variables ambientales del sujeto incluyen, sin limitarse a, edad, sexo, peso, altura, patología, tejido donde se realizará la cirugía, tensión arterial, cantidad de glucosa en sangre, etc. Por lo tanto, la frase "recoger una variable de un sujeto" se refiere a la recolección y/o registro de los datos relativos al estado clínico o fisiológico de un sujeto.

20 En la presente invención, la variable ambiental a recoger es la edad del sujeto.

Como entiende un experto en la materia, dicha recogida de datos puede realizarse mediante cualquier metodología o protocolo seguido por los profesionales sanitarios.

25 *Etapa (c) del método de la invención: asignar un valor β a los polimorfismos y datos del sujeto*

Como ya se ha mencionado, el método de la invención tiene en cuenta variables genéticas y la variable ambiental 'edad' del sujeto. Previamente a la aplicación algoritmo de la invención, se asigna un valor, en la presente invención valor β , a los polimorfismos analizados en la etapa (a), y a la variable ambiental recogida del sujeto en la etapa (b) del método de la invención.

35 Así, una tercera etapa del método de la invención, la etapa (c), comprende asignar un valor β a los polimorfismos genéticos analizados en la etapa (a) según la Tabla 2, y asignar un valor β a variable ambiental recogida del sujeto en la etapa (b) según la Tabla 2.

5 Tabla 2. Valores de β específicos para cada posibilidad de las variables analizadas. En el caso de los polimorfismos genéticos analizados en la etapa (a) del método, un valor β es asignado para cada polimorfismo (según el genotipo del sujeto para ese polimorfismo). En el caso de las variables ambientales recogidas del sujeto en la etapa (b) del método, un valor β es asignado para cada dato recogido.

Variable	Posibilidad	Valores de β
Rangos edad	<35 años	0,159
	36-49 años	0,525
	50-69 años	1,441
	>69	0,000
rs4880 (o cualquier polimorfismo en desequilibrio de ligamiento con él)	A:A	0,107
	G:A	1,469
	G:G	0,000
rs660339(o cualquier polimorfismo en desequilibrio de ligamiento con él)	C:C	1,415
	C:T	-0,241
	T:T	0,000
rs1260326 (o cualquier polimorfismo en desequilibrio de ligamiento con él)	C:C	0,786
	C:T	-0,382
	T:T	0,000
rs2229765 (o cualquier polimorfismo en desequilibrio de ligamiento con él)	A:A	-1,423
	A:G	-0,669
	G:G	0,000
rs1042714 (o cualquier polimorfismo en desequilibrio de ligamiento con él)	C:C	-1,466
	C:G	-1,992
	G:G	0,000
rs1870377 (o cualquier polimorfismo en desequilibrio de ligamiento con él)	A:A	-2,380
	A:T	-0,110
	T:T	0,000
rs2665802 (o cualquier polimorfismo en desequilibrio de ligamiento con él)	A:A	1,173
	A:T	1,606
	T:T	0,000

Así, en el caso de los polimorfismos genéticos analizados en la etapa (a) del método de la invención, para cada polimorfismo, según el genotipo del sujeto, se asigna un valor β . En el caso de la variable ambiental recogida del sujeto en la etapa (b) del método de la invención, un valor β es asignado en función de la edad del sujeto analizado.

5 El sumatorio de los valores β asignados en esta etapa (c) del método de la invención, constituye el valor β_1x que forma parte del algoritmo aplicado en la siguiente etapa del método de la invención.

10

Etapa (d) del método de la invención: Cálculo del valor P mediante la aplicación de un algoritmo.

La siguiente etapa del método de la invención, la etapa (d), comprende calcular la 15 probabilidad P de un sujeto a responder positivamente al tratamiento con PRP, mediante la aplicación del algoritmo:

$$P = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1x)}}$$

en donde,

β_0 es 0,662

20 β_1x es la suma de todos los valores β asignados en la etapa (c).

Este algoritmo, de aquí en adelante el algoritmo de la invención, relaciona la probabilidad de un sujeto a responder positivamente al tratamiento con PRP, según los 25 polimorfismos genéticos previamente analizados y el dato de la variable ambiental 'edad' previamente recogida del sujeto, a través de β_1x .

β_1x , es la suma de todos los valores β asignados en la etapa (c) a cada una de las variables: a cada polimorfismo analizado en la etapa (a) del método de la invención, en función del genotipo, se asigna un valor β según la Tabla 2; a cada dato recogido del 30 sujeto en la etapa (b) del método de la invención, se asigna también un valor β según la Tabla 2. La suma de todos los valores β , constituye el valor β_1x comprendido en el algoritmo de la invención.

La aplicación del algoritmo de la invención permite calcular el valor P de la probabilidad de un sujeto a responder positivamente al tratamiento con PRP. En la presente invención, "la probabilidad P de un sujeto de responder positivamente al tratamiento con PRP" (también denominado, "valor P" a secas, términos usados indistintamente en la 5 presente invención), se refiere a la probabilidad de un sujeto de responder positivamente al tratamiento con PRP. El valor calculado está en tanto por uno, y puede ser también interpretado en términos de porcentaje, multiplicando el valor calculado por 100. Así, el método de la invención permite predecir la probabilidad de un sujeto de responder positivamente al tratamiento con PRP. En la presente invención se entiende que un 10 sujeto "responde positivamente a un tratamiento" cuando el sujeto mejora sintomatológicamente de su condición patológica, es decir, uno o varios de los síntomas asociados a una patología desaparecen, disminuyen o se alivian.

Kit de la invención y sus usos

15 La puesta en práctica del método de la invención se fundamenta, además de en la recolección de variables ambientales relativos al sujeto, en el análisis de polimorfismos genéticos, los polimorfismos de la invención. Los medios empleados para el análisis de dichos polimorfismos genéticos pueden estar formando parte de un kit.

20 Así, en otro aspecto, la invención se refiere a un kit, de ahora en adelante el "kit de la invención", que comprende los medios necesarios para analizar *in vitro* en una muestra biológica aislada de un sujeto, al menos, uno, dos tres, cuatro o cinco polimorfismos genéticos seleccionados de la lista que consiste en rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2, y rs1260326 del gen GCKR, en donde cada uno 25 de dichos polimorfismos puede reemplazarse por otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él.

Los polimorfismos genéticos descritos en el kit de la invención han sido descritos en aspectos inventivos anteriores junto con una explicación del concepto "polimorfismo que 30 se encuentre en desequilibrio de ligamiento con dichos polimorfismos genéticos". Todas estas definiciones y explicaciones son aplicables al kit de la invención.

Por otro lado, en una realización preferida, el kit de la invención comprende, además, los medios necesarios para analizar *in vitro*, en la muestra biológica aislada del sujeto, 35 al menos, uno, dos, tres, o cuatro polimorfismos genéticos seleccionados de la lista que consiste en rs2229765 del gen IGFR-1, rs1870377 del gen VEGFR2, y rs1042714 del

gen ADRB2, en donde cada uno de dichos polimorfismos puede reemplazarse por otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él.

En otra realización más preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones 5 preferidas, el kit de la invención comprende los medios necesarios para analizar *in vitro*, en una muestra biológica aislada del sujeto, los polimorfismos genéticos rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2, rs1260326 del gen GCKR, rs2229765 del gen IGFR-1, rs1870377 del gen VEGFR2, y rs1042714 del gen ADRB2.

10 En la presente invención se entiende por “medios necesarios para analizar *in vitro* los polimorfismos genéticos”, a todos aquellos reactivos que se emplean para analizar *in vitro* los polimorfismos de la invención (cebadores, sondas, tampones, enzimas, coenzimas, sustratos). Por otro lado, los kits pueden incluir todos los soportes y 15 recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización (tubos de plásticos, placas, reactivos, etc.). Los kits pueden contener además otras moléculas, genes, proteínas o sondas de interés, que sirvan como controles positivos y negativos.

Como sabe un experto en la materia, los polimorfismos genéticos pueden analizarse mediante técnicas y métodos conocidos en el estado de la técnica, incluyendo técnicas 20 y métodos diferentes a los aquí presentados. Estos métodos y técnicas se han explicado en el aspecto inventivo anterior, y tanto ellas como sus realizaciones preferidas, son aplicables al kit de la invención.

En una realización preferida del kit de la invención, sola o en combinación con las 25 realizaciones preferidas anteriores, los medios necesarios para analizar *in vitro* los polimorfismos de la invención comprenden los reactivos necesarios para llevar a cabo la técnica de amplificación, preferiblemente PCR, y/o secuenciación.

En otra realización preferida del kit de la invención, sola o en combinación con las 30 realizaciones preferidas anteriores, los medios para analizar *in vitro* los polimorfismos de la invención comprenden cebadores y/o sondas que detectan de forma específica dichos polimorfismos genéticos.

En una realización más preferida del kit de la invención, sola o en combinación con el 35 reto de realizaciones preferidas, los cebadores y/o sondas comprenden, o consisten en, las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID

NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, 5 SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, y/o cualquier combinación de ellos.

Más preferiblemente, los medios comprenden sondas que detectan de forma específica los polimorfismos de la invención. Aún más preferiblemente, las sondas que detectan dichos polimorfismos se seleccionan de la lista que consiste en las secuencias: SEQ ID 10 NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, y cualquier combinación de ellos.

En una realización preferida del kit de la invención, sola o en combinación con el resto 15 de realizaciones preferidas, la muestra biológica procede de cualquier tejido susceptible de una extracción de ADN. La muestra biológica podría ser, por ejemplo, pero sin limitarse a, un tejido o una muestra de fluido, como sangre, plasma, suero, mucosa oral, lavado broncoalveolar, linfa o fluido ascítico. En una realización más preferida del kit de la invención, la muestra biológica es seleccionada de la lista que consiste en tejido, 20 mucosa oral, sangre, plasma, suero y linfa.

Preferiblemente, los kits comprenden además las instrucciones para llevar a cabo el análisis de los polimorfismos de la invención y/o el método de la invención. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits mencionados en una variedad de 25 formas, uno o más de los cuales pueden estar presentes en el kit. Una forma en la que estas instrucciones pueden estar presentes es como información impresa en un medio o sustrato adecuado, p. ej., una hoja o hojas de papel en las que se imprime la información, en el embalaje del kit, en un inserto de paquete, etc. Otro medio sería un medio legible por ordenador, por ejemplo, un CD, un USB, etc., en el que se haya 30 registrado la información. Otro medio que puede estar presente es una dirección de sitio web que puede utilizarse a través de Internet para acceder a la información en un sitio remoto. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

El kit de la invención, que comprende los medios para analizar *in vitro* los polimorfismos 35 de la invención, tiene utilidad para poner en práctica el método de la invención. Así, en

otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del kit de la invención en el método de la invención.

Los términos empleados para definir el kit y uso del kit de la invención han sido 5 explicados para el método de la invención, y tanto ellos como sus realizaciones preferidas son aplicables también para el kit de la invención y su uso en el método de la invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10

Figura 1. Gráfico de curva COR del modelo de predicción teniendo en cuenta como variables los polimorfismos genéticos rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2, rs1260326 del gen GCKR, rs2229765 del gen IGFR-1, rs1870377 del gen VEGFR2, rs1042714 del gen ADRB2 y la variable ambiental rango 15 de edad, en la cual cada punto de la gráfica muestra un posible punto de corte para el modelo en el cual informa sobre su sensibilidad concreta en ese punto (eje Y) con respecto a su 1- especificidad (eje X). Diagonalmente en el gráfico (desde 0,0 hasta 1,1) se representa la línea diagonal de referencia o línea de no discriminación. Los segmentos de la diagonal se generan mediante empates.

20

Figura 2. Gráfico de curva COR del modelo de predicción teniendo en cuenta como variable genética el polimorfismo rs2665802 del gen GH1 y como variable ambiental el rango de edad. Los segmentos de la diagonal se generan mediante empates.

25

Figura 3. Gráfico de curva COR del modelo de predicción teniendo en cuenta como variable genética el polimorfismo rs4880 del gen SOD2 y como variable ambiental el rango de edad. Los segmentos de la diagonal se generan mediante empates.

30

Figura 4. Gráfico de curva COR del modelo de predicción teniendo en cuenta como variable genética el polimorfismo rs660339 del gen UCP2 y como variable ambiental el rango de edad. Los segmentos de la diagonal se generan mediante empates.

35

Figura 5. Gráfico de curva COR del modelo de predicción teniendo en cuenta como variable genética el polimorfismo rs1260326 del gen GCKR y como variable ambiental el rango de edad. Los segmentos de la diagonal se generan mediante empates.

Figura 6. Gráfico de curva COR del modelo de predicción teniendo en cuenta como variable genética los polimorfismos genéticos rs2665802 del gen GH1 y rs4880 del gen SOD2, y como variable ambiental el rango de edad. Los segmentos de la diagonal se generan mediante empates.

5

Figura 7. Gráfico de curva COR del modelo de predicción teniendo en cuenta como variable genética los polimorfismos genéticos rs2665802 del gen GH1 y rs660339 del gen UCP2, y como variable ambiental el rango de edad. Los segmentos de la diagonal se generan mediante empates.

10

Figura 8. Gráfico de curva COR del modelo de predicción teniendo en cuenta como variable genética los polimorfismos genéticos rs2665802 del gen GH1 y rs1260326 del gen GCKR, y como variable ambiental el rango de edad. Los segmentos de la diagonal se generan mediante empates.

15

Figura 9. Gráfico de curva COR del modelo de predicción teniendo en cuenta como variable genética los polimorfismos genéticos rs4880 del gen SOD2 y rs660339 del gen UCP2, y como variable ambiental el rango de edad. Los segmentos de la diagonal se generan mediante empates.

20

Figura 10. Gráfico de curva COR del modelo de predicción teniendo en cuenta como variable genética los polimorfismos genéticos rs4880 del gen SOD2 y rs1260326 del gen GCKR, y como variable ambiental el rango de edad. Los segmentos de la diagonal se generan mediante empates.

25

Figura 11. Gráfico de curva COR del modelo de predicción teniendo en cuenta como variable genética los polimorfismos genéticos rs660339 del gen UCP2 y rs1260326 del gen GCKR, y como variable ambiental el rango de edad. Los segmentos de la diagonal se generan mediante empates.

30

Figura 12. Gráfico de curva COR del modelo de predicción teniendo en cuenta como variable genética los polimorfismos genéticos rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2 y rs660339 del gen UCP2, y como variable ambiental el rango de edad. Los segmentos de la diagonal se generan mediante empates.

35

Figura 13. Gráfico de curva COR del modelo de predicción teniendo en cuenta como variable genética los polimorfismos genéticos rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2 y rs1260326 del gen GCKR, y como variable ambiental el rango de edad. Los segmentos de la diagonal se generan mediante empates.

5

Figura 14. Gráfico de curva COR del modelo de predicción teniendo en cuenta como variable genética los polimorfismos genéticos rs2665802 del gen GH1, rs660339 del gen UCP2 y rs1260326 del gen GCKR, y como variable ambiental el rango de edad. Los segmentos de la diagonal se generan mediante empates.

10

Figura 15. Gráfico de curva COR del modelo de predicción teniendo en cuenta como variable genética los polimorfismos genéticos rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2 y rs1260326 del gen GCKR, y como variable ambiental el rango de edad. Los segmentos de la diagonal se generan mediante empates.

15

Figura 16. Gráfico de curva COR del modelo de predicción teniendo en cuenta como variable genética los polimorfismos genéticos rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2 y rs1260326 del gen GCKR, y como variable ambiental el rango de edad. Los segmentos de la diagonal se generan mediante empates.

20

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de la invención, incluyendo un ejemplo de la aplicación del método de la invención en la predicción de probabilidad de un sujeto de responder positivamente al tratamiento con PRP.

1. Metodología

Se seleccionaron un total de 221 pacientes que habían sido tratados con PRP por el equipo de traumatología de la Unidad de Cirugía Artroscópica del doctor Mikel Sanchez.

30 A todos ellos se les tomo una muestra de frotis bucal mediante los hisopos 4N6FLOQSwab-Life Technologies. El ADN de las muestras fue extraído mediante QIAmp DNA Mini kit (Qiagen), y cuantificado fluorimétricamente utilizando Qubit (Life Technologies). Las muestras de ADN resultantes fueron analizadas mediante un análisis de genotipado de SNPs (polimorfismos rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2, rs1260326 del gen GCKR, rs2229765 del gen IGFR-1, rs1870377 del gen VEGFR2, rs1042714 del gen ADRB2) utilizando la metodología

Biomark HD system (Fluidigm). Los pacientes fueron categorizados teniendo en cuenta el siguiente factor ambiental:

- Rango de edad:
 - <35 años
 - 36-49 años
 - 50-69 años

A partir de los datos relativos a la variable ambiental 'edad' y los polimorfismos genéticos, los inventores aplicaron el siguiente algoritmo para la obtención de probabilidad de un sujeto de responder positivamente al tratamiento con PRP (denominado como P o valor P):

$$P = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 x)}}$$

en donde,

15 $\beta_0 = 0,662$

$\beta_1 x$ es la suma de todos los valores β asignados según la tabla 2, previamente descrita en el presente documento.

Así, se tomó como ejemplo el caso de un paciente varón que presentaba una patología derecha articular en la rodilla derecha, para el cual se recogieron los siguientes datos:

Edad: 53

Además, se realizó un perfil genético para los polimorfismos rs2665802 del gen GH1, 25 rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2, rs1260326 del gen GCKR, rs2229765 del gen IGFR-1, rs1870377 del gen VEGFR2, rs1042714 del gen ADRB2, obteniendo el siguiente perfil genético:

- | | |
|---------------|-----|
| rs2665802: | A:T |
| 30 rs4880: | G:A |
| rs660339: | C:T |
| rs1260326: | C:T |
| rs2229765: | A:G |
| rs1870377: | A:T |
| 35 rs1042714: | C:G |

Una vez obtenidos los datos, se obtuvo el valor de β para cada uno, y se sumaron todas las β para obtener el valor β_1x . Dicho valor, así como la asignación de cada valor β (según la Tabla 2 previamente descrita en el presente documento) viene representado 5 en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores β para las variables recogidas para el paciente problema.

Variable	Posibilidad	Beta(β)
rs2665802	A:T	1,606
rs4880	A:A	0,107
rs660339	C:C	1,415
rs1260326	C:T	-0,382
rs2229765	A:A	-1,423
rs1870377	A:T	-0,110
rs1042714	C:C	-1,466
Edad	50-69 años	1,441
		$\beta_1 X = 1,187238773$

Una vez obtenido el valor $\beta_1x = 1,187238773$ y teniendo en cuenta que $\beta_0 = 0,662$, se 10 reemplazan las variables con dichos valores en la fórmula:

$$P = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1x)}}$$

obteniendo como resultado una $P = 0,86408$, es decir una probabilidad del 86,40% de 15 responder favorablemente al tratamiento con PRP.

2. Resultados

Siguiendo una metodología como la explicada anteriormente en pacientes, se aplicó el algoritmo de la invención, es decir

$$20 \quad P = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1x)}}$$

teniendo en cuenta las diferentes variables genéticas y ambientales, y realizándose para cada caso un análisis ROC.

2.1. Análisis ROC teniendo en cuenta los polimorfismos rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2, rs1260326 del gen GCKR, rs2229765 del gen IGFR-1, rs1870377 del gen VEGFR2 y rs1042714 del gen ADRB2, y la variable rango de edad.

5

Se realizó un análisis ROC (Figura 1), estableciendo la probabilidad de 69,00% de responder al tratamiento con PRP como punto de corte para clasificar al sujeto o paciente en cuestión como de respondedor o no respondedor.

- 10 Así, si el valor P calculado para el sujeto es mayor a 0,69, el sujeto es clasificado como de alto probabilidad de responder al tratamiento con PRP, mientras que si el valor P es menor a 0,69, el sujeto es clasificado como de probabilidad de responder al tratamiento con PRP.
- 15 Tomando el como ejemplo el paciente varón para el que se obtuvo una $P = 0,86408$, dicho valor es netamente superior al punto de corte seleccionado 0,69, por tanto, dicho paciente tiene alta probabilidad de responder al tratamiento con PRP.

El modelo mostró unos valores de Sensibilidad del: 81,9% y de especificidad del 72,7%.

- 20 A continuación, se muestra una tabla de clasificación de los pacientes "Observado" frente a lo "Pronosticado" por el modelo (siendo 0 no respondedor y 1 si respondedor) (Tabla 4).

Tabla 4. Tabla de clasificación de los pacientes^a

Observado	Pronosticado		Porcentaje correcto
	RESP (0 no y 1 sí)	1	
Paso 1	RESP (0 no y 1 sí)	40	72,7
	1	30	81,9
	Porcentaje global		79,6

a. El valor de corte es ,690

25

En la Tabla 5, se ofrece el valor del área bajo la curva para el modelo, con una AUC (area under the curve) de 0,839 y su intervalo de confianza 95% (IC 95%) fue 0,777-0,902.

Tabla 5: Área bajo la curva

Variables de resultado de prueba: Probabilidad pronosticada

Área	Desv. Error ^a	Significación asintótica ^b	95% de intervalo de confianza asintótico	
			Límite inferior	Límite superior
,839	,032	,000	,777	,902

Las variables de resultado de prueba: Probabilidad pronosticada tienen, como mínimo, un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo. Las estadísticas podrían estar sesgadas.

- a. Bajo el supuesto no paramétrico
- b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

2.2. Análisis COR teniendo en cuenta 2, 3, 4 y 5 variables genéticas.

- Además del análisis COR teniendo en cuenta todas las variables genéticas y la variable ambiental 'edad' del apartado anterior, se llevaron a cabo análisis ROC teniendo en la combinación de un mayor número de variables, demostrando que también tienen utilidad en el cálculo de la probabilidad de un sujeto a responder positivamente al tratamiento con PRP, tal y como muestran los resultados obtenidos y resumidos en la Tabla 6, la Tabla 7, la Tabla 8 y la Tabla 9 (localizadas al final de los Ejemplo).
- 10

2.2.1 – Una variable genética y la variable ambiental edad.

- En la Tabla 6 se muestra un resumen de los resultados arrojados por el análisis COR (2 variables) en función de una variable genética (polimorfismo) y una variable ambiental (edad) a la hora de aplicar el algoritmo. Estos resultados derivan de las figuras 2 a 5:
- 15

- La Figura 2 muestra la curva COR al aplicar el algoritmo teniendo en cuenta como variable genética el polimorfismo rs2665802 del gen GH1 y como variable ambiental el rango de edad.

20

- La Figura 3 muestra la curva COR al aplicar el algoritmo teniendo en cuenta como variable genética el polimorfismo rs4880 del gen SOD2 y como variable ambiental el rango de edad.

- La Figura 4 muestra la curva COR al aplicar el algoritmo teniendo en cuenta como variable genética el polimorfismo rs660339 del gen UCP2 y como variable ambiental el rango de edad.

5

- La Figura 5 muestra la curva COR al aplicar el algoritmo teniendo en cuenta como variable genética el polimorfismo rs1260326 del gen GCKR y como variable ambiental el rango de edad.

10 2.2.2 – Dos variables genéticas y la variable ambiental edad.

En la Tabla 7 se muestra un resumen de los resultados arrojados por el análisis COR (3 variables) en función de dos variables genéticas (2 polimorfismos) y una variable ambiental (edad) a la hora de aplicar el algoritmo. Estos resultados derivan de las figuras

15 6 a 11:

- La Figura 6 muestra la curva COR al aplicar el algoritmo teniendo en cuenta como variables genéticas los polimorfismos genéticos rs2665802 del gen GH1 y rs4880 del gen SOD2, y como variable ambiental el rango de edad.

20

- La Figura 7 muestra la curva COR al aplicar el algoritmo teniendo en cuenta como variables genéticas los polimorfismos genéticos rs2665802 del gen GH1 y rs660339 del gen UCP2, y como variable ambiental el rango de edad.

25

- La Figura 8 muestra la curva COR al aplicar el algoritmo teniendo en cuenta como variables genéticas los polimorfismos genéticos rs2665802 del gen GH1 y rs1260326 del gen GCKR, y como variable ambiental el rango de edad.

30

- La Figura 9 muestra la curva COR al aplicar el algoritmo teniendo en cuenta como variables genéticas los polimorfismos genéticos rs4880 del gen SOD2 y rs660339 del gen UCP2, y como variable ambiental el rango de edad.

35

- La Figura 10 muestra la curva COR al aplicar el algoritmo teniendo en cuenta como variables genéticas los polimorfismos genéticos rs4880 del gen SOD2 y rs1260326 del gen GCKR, y como variable ambiental el rango de edad

- La Figura 11 muestra la curva COR al aplicar el algoritmo teniendo en cuenta como variables genéticas los polimorfismos genéticos rs660339 del gen UCP2 y rs1260326 del gen GCKR, y como variable ambiental el rango de edad.

5 2.2.3 – Tres variables genéticas y la variable ambiental 'edad'.

En la Tabla 8 se muestra un resumen de los resultados arrojados por el análisis COR (4 variables) en función de 3 variables genéticas y la variable ambiental 'edad' tenidas en cuenta a la hora de aplicar el algoritmo. Estos resultados derivan de las figuras 12 a 15:

10

- La Figura 12 muestra la curva COR al aplicar el algoritmo teniendo en cuenta como variables genéticas los polimorfismos genéticos rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2 y rs660339 del gen UCP2, y como variable ambiental el rango de edad.

15

- La Figura 13 muestra la curva COR al aplicar el algoritmo teniendo en cuenta como variables genéticas los polimorfismos genéticos rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2 y rs1260326 del gen GCKR, y como variable ambiental el rango de edad.

20

- La Figura 14 muestra la curva COR al aplicar el algoritmo teniendo en cuenta como variables genéticas los polimorfismos genéticos rs2665802 del gen GH1, rs660339 del gen UCP2 y rs1260326 del gen GCKR, y como variable ambiental el rango de edad.

25

- La Figura 15 muestra la curva COR al aplicar el algoritmo teniendo en cuenta como variables genéticas los polimorfismos genéticos rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2 y rs1260326 del gen GCKR, y como variable ambiental el rango de edad.

30

2.2.4 – Cuatro variables genéticas y la variable ambiental 'edad'.

En la Tabla 9 (página siguiente) se muestra un resumen de los resultados arrojados por el análisis ROC (5 variables) en función de 4 variables genéticas y la variable ambiental 'edad' tenidas en cuenta a la hora de aplicar el algoritmo. Estos resultados derivan de la Figura 16:

- 5
- La Figura 16 muestra la curva COR al aplicar el algoritmo teniendo en cuenta como variables genéticas los polimorfismos genéticos rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2 y rs1260326 del gen GCKR, y como variable ambiental el rango de edad.

Las Tablas 6, 7, 8 y 9 se muestran en las siguientes páginas.

1 variable ambiental (edad) frente a 1 polimorfismo (variable genética)						
	GEN POLIMORFISMO	% Pronosticado total	Valor de corte	Especificidad	Sensibilidad	Área de la curva ROC
EDAD	GH1 rs2665802	62,5	0,718	62,9	61,4	0,662
	SOD2 rs44300	57,3	0,758	56,1	61,4	0,654
	UCP2 rs660339	71,3	0,692	73,5	50	0,677
	GCKR rs1260326	67,7	0,757	73,1	51,7	0,66

Tabla 6: Resumen de los resultados arrojados por el análisis ROC (2 variables) en función de las variables genéticas y ambientales tenidas en cuenta a la hora de aplicar el algoritmo

1 ambiental frente a 2 polimorfismos					
GEN	POLIMORFISMO	% Pronosticado total	Valor de corte	Especificidad	Sensibilidad
GH1	rs2665802	69,7	0,710	72,3	61,8
SOD2	rs4880				0,719
GH1	rs2665802	73,1	0,710	76,6	62,5
UCP2	rs660339				0,726
GH1	rs2665802	70,3	0,707	72,3	64,3
GCKR	rs1260326				0,696
SOD2	rs4880	65,4	0,723	63,2	71,9
UCP2	rs660339				0,702
SOD2	rs4880	65,8	0,729	64,3	
GCKR	rs1260326				0,699
UCP2	rs660339	69,0	0,693	71,9	60,3
GCKR	rs1260326				0,708

Tabla 7. Resumen de los resultados arrojados por el análisis ROC (3 variables) en función de las variables genéticas y ambientales tenidas en cuenta a la hora de aplicar el algoritmo.

1 ambiental frente a 3 polimorfismos						
GEN	POLIMORFISMO	% Pronosticado total	Valor de corte	Especificidad	Sensibilidad	Área de la curva ROC
GH1	rs2665802	73,8	0,72	75,9	67,3	0,77
SOD2	rs4880					
UCP2	rs660339					
GH1	rs2665802					
SOD2	rs4880	72,9	0,71	76,5	61,8	0,75
GCKR	rs1260326					
CDAD						
GH1	rs2665802					
UCP2	rs660339	71,2	0,71	72,9	66,1	0,73
GCKR	rs1260326					
SOD2	rs4880					
UCP2	rs660339	71,1	0,71	76,0	66,1	0,73
GCKR	rs1260326					

Tabla 8. Resumen de los resultados arrojados por el análisis ROC (4 variables) en función de las variables genéticas y ambientales tenidas en cuenta a la hora de aplicar el algoritmo.

1 ambiental frente a 4 polimorfismo					
GEN	POLIMORFISMO	% Pronosticado total	Valor de corte	Especificidad	Sensibilidad
EDAD	GH1 rs2665802				
	SOD2 rs48880	73,3	0,8	72,3	
	UCP2 rs660339				
	GCKR rs1260326				

Tabla 9. Resumen de los resultados arrojados por el análisis ROC (5 variables) en función de las variables genéticas y ambientales tenidas en cuenta a la hora de aplicar el algoritmo.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* de obtención de datos útiles para calcular la probabilidad de un sujeto responder positivamente al tratamiento con Plasma Rico en Plaquetas (PRP),
- 5 que comprende las siguientes etapas:
- (a) analizar en una muestra biológica aislada del sujeto, al menos, un polimorfismo genético seleccionado de la lista que consiste en rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2, y rs1260326 del gen GCKR, en donde cada
- 10 uno de dichos polimorfismos puede reemplazarse por otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él con una medida de desequilibrio de ligamiento r^2 mayor o igual a 0,8;
- (b) recoger la variable ambiental 'edad' del sujeto,
- 15 (c) asignar un valor β a los polimorfismos genéticos analizados en la etapa (a) según la Tabla 2, y asignar un valor β a la variable ambiental recogida del sujeto en la etapa (b) según la Tabla 2; y
- 20 (d) calcular la probabilidad P de un sujeto de responder positivamente al tratamiento con PRP, mediante la aplicación del algoritmo:
- $$P = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 x)}}$$
- en donde,
- 25 β_0 es 0,662, y
 $\beta_1 x$ es la suma de todos los valores β asignados en la etapa (c).
2. El método según la reivindicación 1, en donde la etapa (a) comprende analizar, al menos, dos polimorfismos genéticos seleccionados de la lista que consiste en el
- 30 rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2, y rs1260326 del gen GCKR en donde cada uno de dichos polimorfismos puede reemplazarse por otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él con una medida de desequilibrio de ligamiento r^2 mayor o igual a 0,8.
- 35 3. El método según la reivindicación 2, en donde la etapa (a) comprende analizar, al menos, tres polimorfismos genéticos seleccionados de la lista que consiste en

rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2, y rs1260326 del gen GCKR, en donde cada uno de dichos polimorfismos puede reemplazarse por otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él con una medida de desequilibrio de ligamiento r^2 mayor o igual a 0,8.

5

4. El método según la reivindicación 3, en donde la etapa (a) comprende analizar, al menos, cuatro polimorfismos genéticos seleccionados de la lista que consiste en rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2, y rs1260326 del gen GCKR, en donde cada uno de dichos polimorfismos puede reemplazarse por

10 otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él con una medida de desequilibrio de ligamiento r^2 mayor o igual a 0,8.

5. El método según la reivindicación 4, en donde los cuatro polimorfismos genéticos son rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2 y rs1260326 del gen GCKR.

6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la etapa (a) además comprende analizar, al menos, un polimorfismo genético seleccionado de la lista que consiste en rs2229765 del gen IGFR-1, rs1870377 del gen VEGFR2, y 20 rs1042714 del gen ADRB2, en donde cada uno de dichos polimorfismos puede reemplazarse por otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él con una medida de desequilibrio de ligamiento r^2 mayor o igual a 0,8.

7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la etapa (a) 25 comprende, analizar los polimorfismos genéticos rs2229765 del gen IGFR-1, rs1870377 del gen VEGFR2, rs1042714 del gen ADRB2, rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2 y rs1260326 del gen GCKR.

8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la muestra 30 biológica procede de cualquier tejido susceptible de una extracción de ADN.

9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el análisis de los polimorfismos que se lleva a cabo en la etapa (a) comprende el empleo de sondas específicas para dichos polimorfismos.

35

10. El método según la reivindicación 9, en donde las sondas se seleccionan de la lista que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID

NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, y cualquier combinación de ellas.

5 11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el análisis de los polimorfismos en la etapa (a) se lleva a cabo mediante PCR y/o secuenciación.

12. Kit que comprende los medios necesarios para analizar *in vitro*, en una muestra biológica aislada de un sujeto, al menos, uno, dos, tres, cuatro polimorfismos genéticos

10 seleccionados de la lista que consiste en rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2, y rs1260326 del gen GCKR, en donde cada uno de dichos polimorfismos puede reemplazarse por otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él con una medida de desequilibrio de ligamiento r^2 mayor o igual a 0,8.

15

13. Kit según la reivindicación 12, que comprende además los medios necesarios para analizar *in vitro*, en la muestra biológica aislada del sujeto, los polimorfismos genéticos rs2229765 del gen IGFR-1, rs1870377 del gen VEGFR2, y/o rs1042714 del gen ADRB2, en donde cada uno de dichos polimorfismos puede reemplazarse por otro polimorfismo 20 que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él con una medida de desequilibrio de ligamiento r^2 mayor o igual a 0,8.

14. Kit según la reivindicación 12 o 13, que comprende los medios necesarios para analizar *in vitro*, en una muestra biológica aislada del sujeto, los polimorfismos genéticos 25 rs2229765 del gen IGFR-1, rs1870377 del gen VEGFR2, rs1042714 del gen ADRB2, rs2665802 del gen GH1, rs4880 del gen SOD2, rs660339 del gen UCP2 y rs1260326 del gen GCKR.

15. Kit según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde los medios 30 necesarios para analizar los polimorfismos genéticos comprenden cebadores y/o sondas.

16. Kit según la reivindicación 15, en donde los cebadores y/o sondas comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada de la lista que consiste en las secuencias SEQ 35 ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO:

17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, y/o cualquier combinación de ellos.

5 17. Kit según la reivindicación 15, en donde los cebadores y/o sondas comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, y cualquier combinación de ellos.

10

18. Uso de un kit según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, en el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

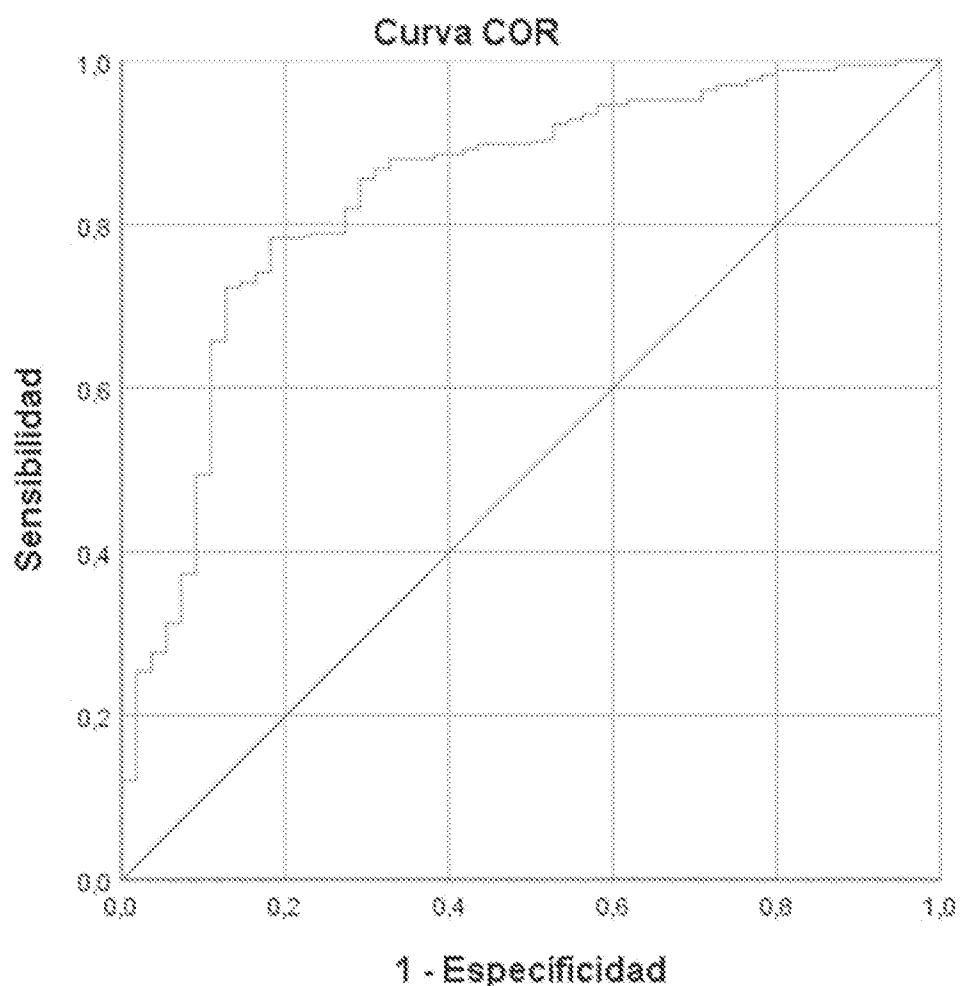


Fig. 1

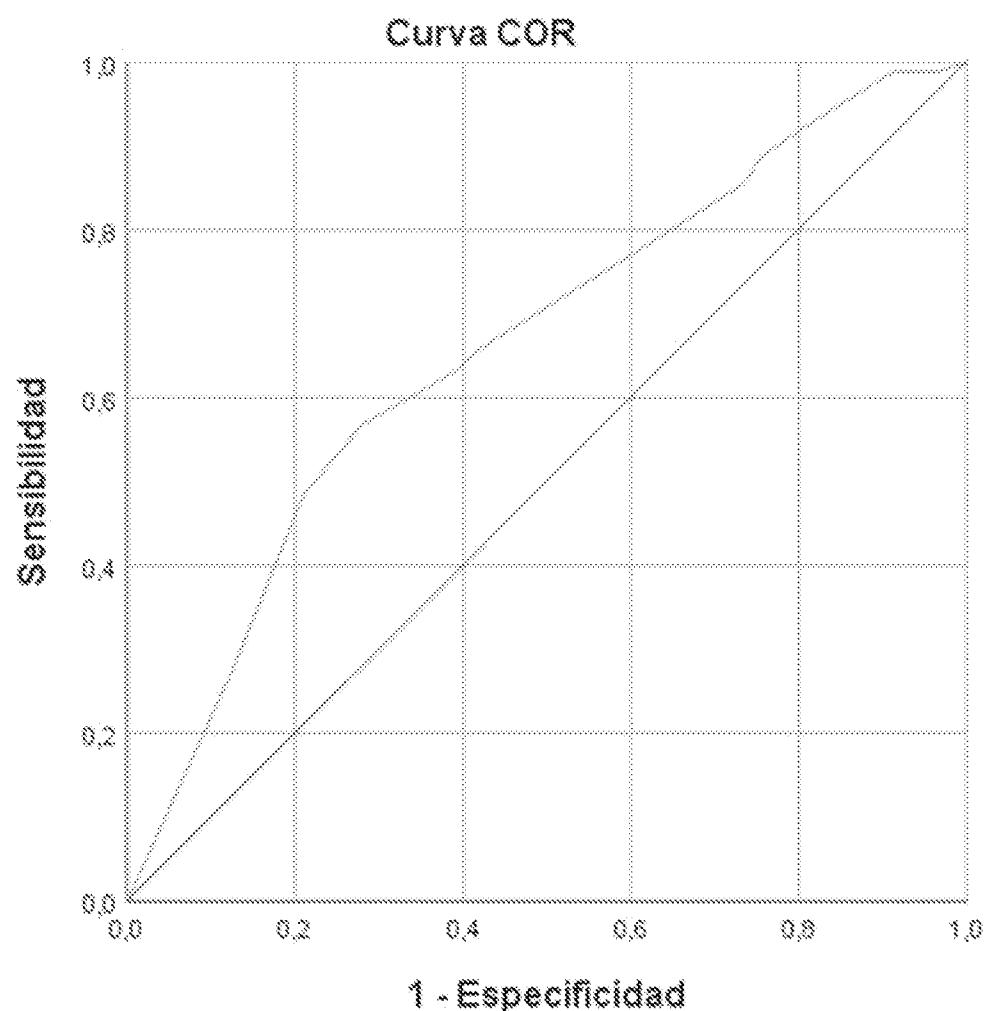


Fig. 2

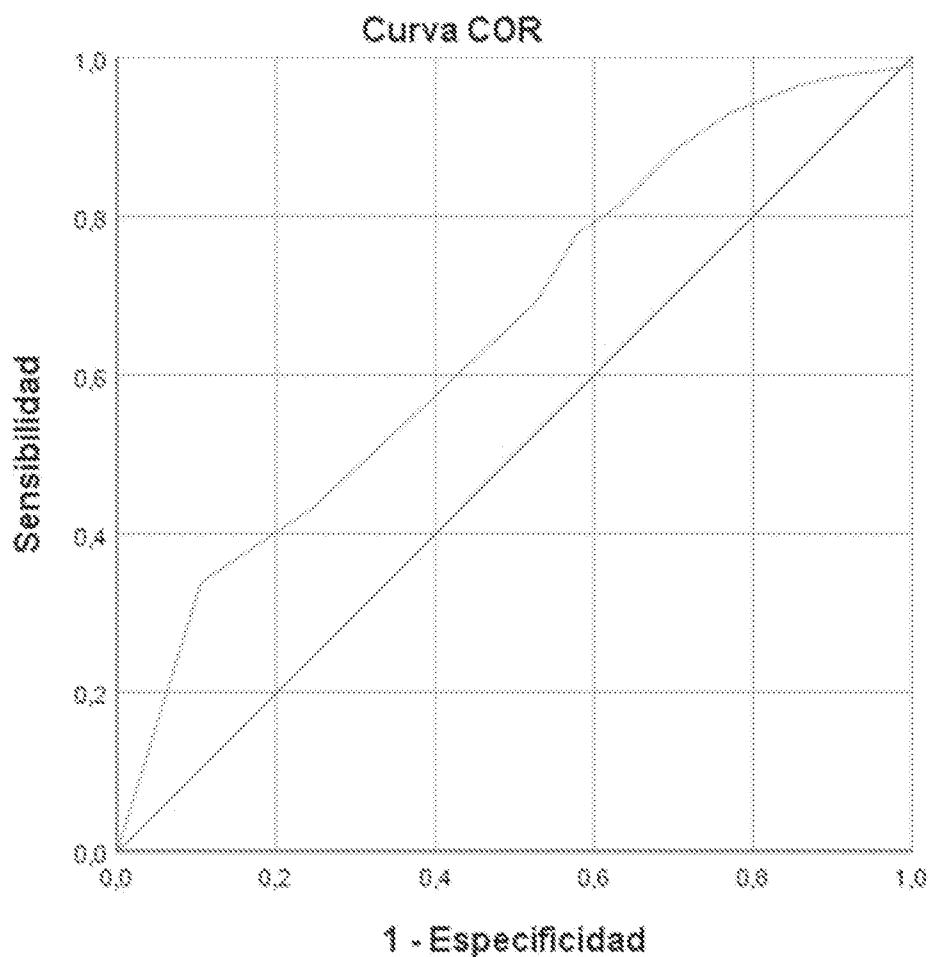


Fig. 3

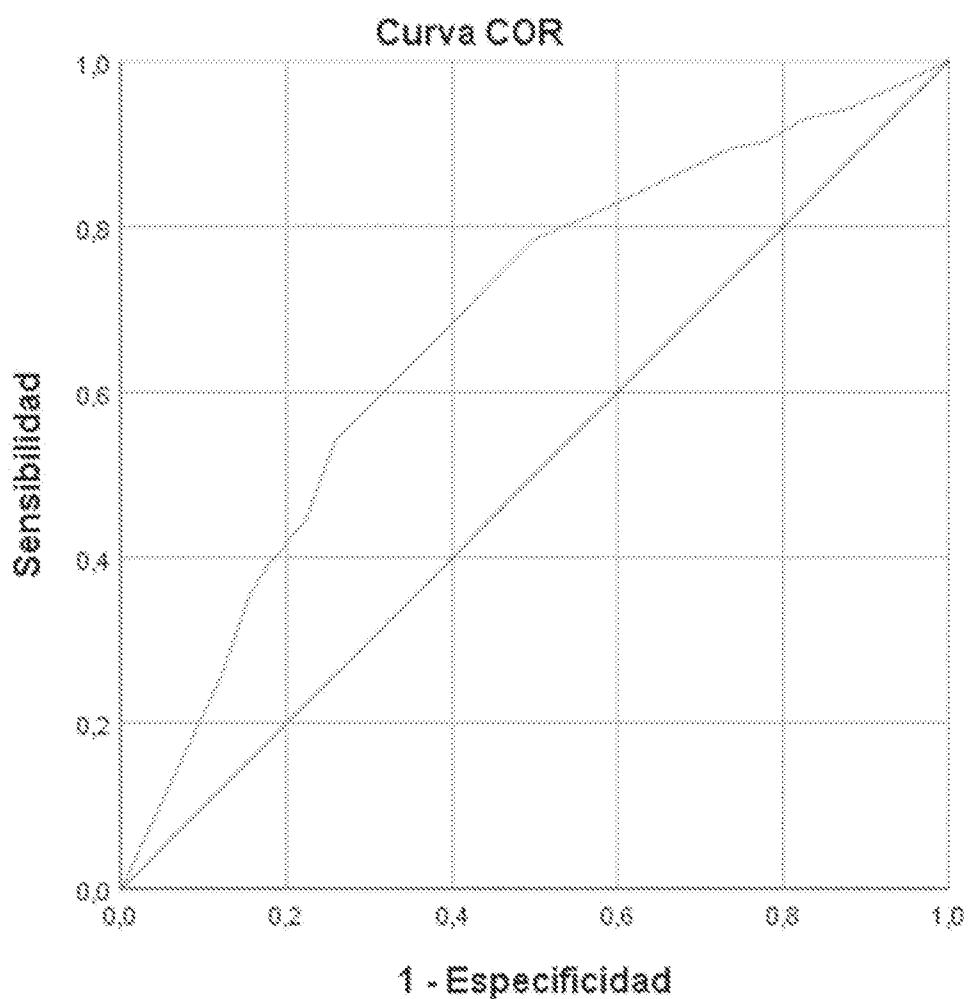


Fig. 4

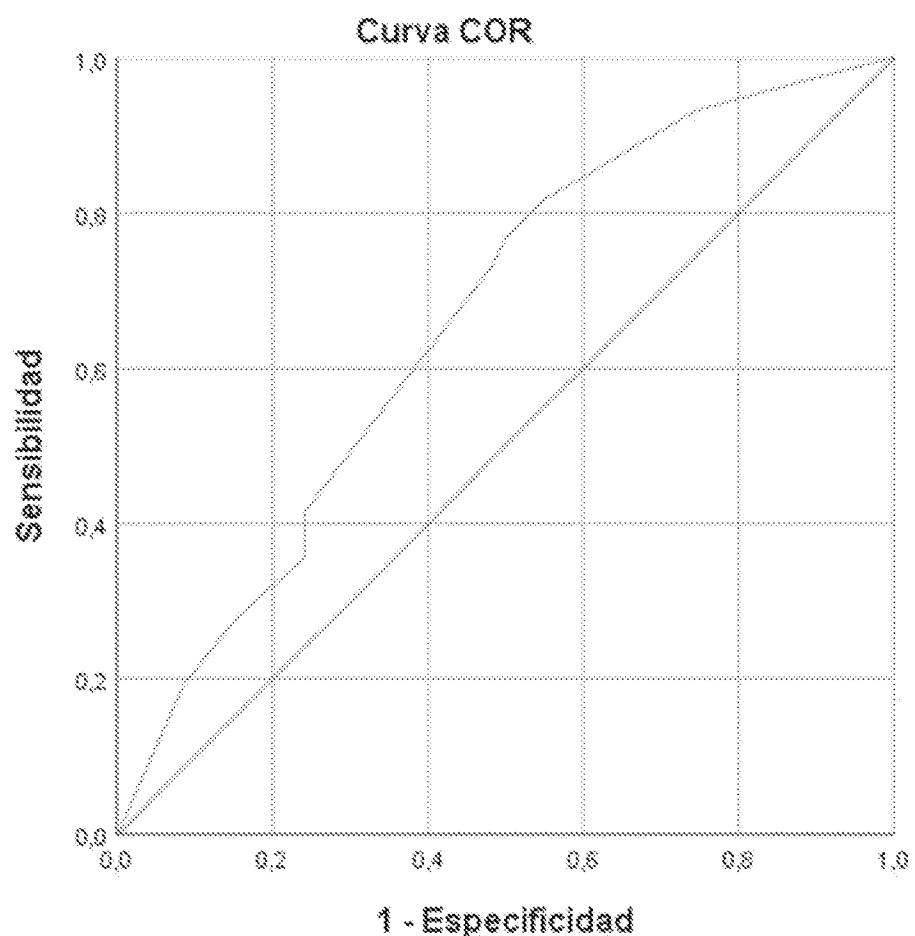


Fig. 5

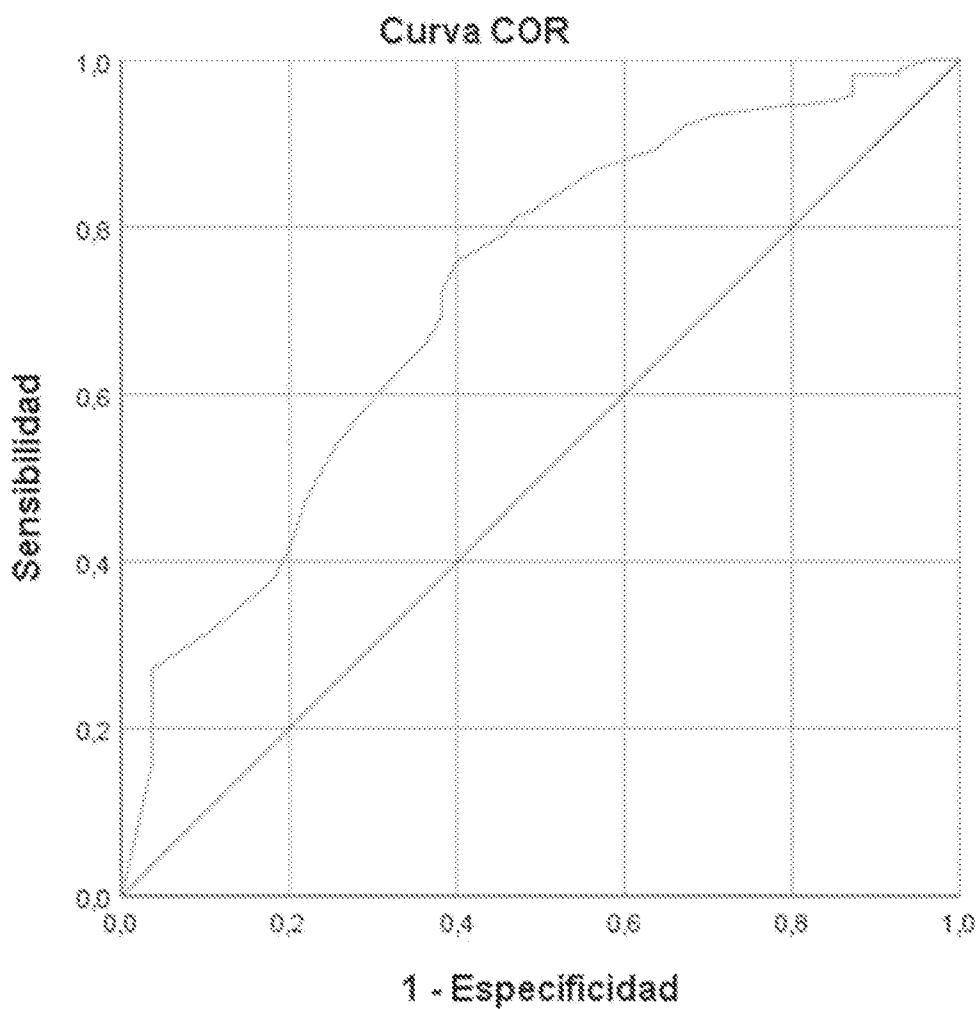


Fig. 6

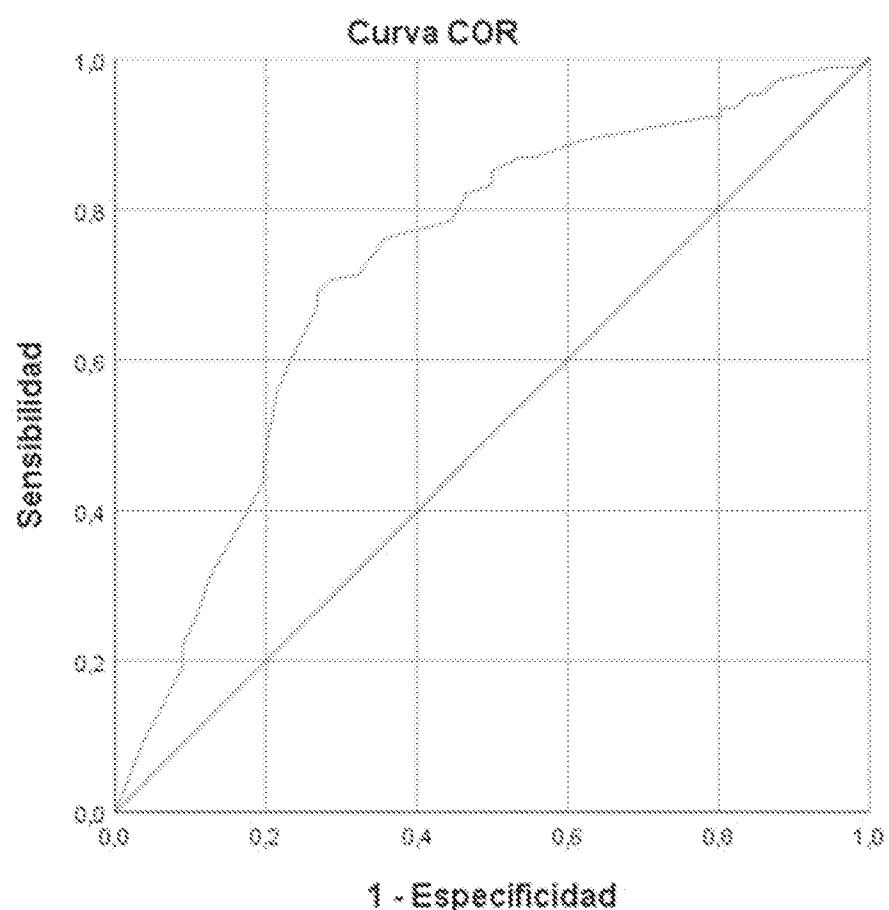


Fig. 7

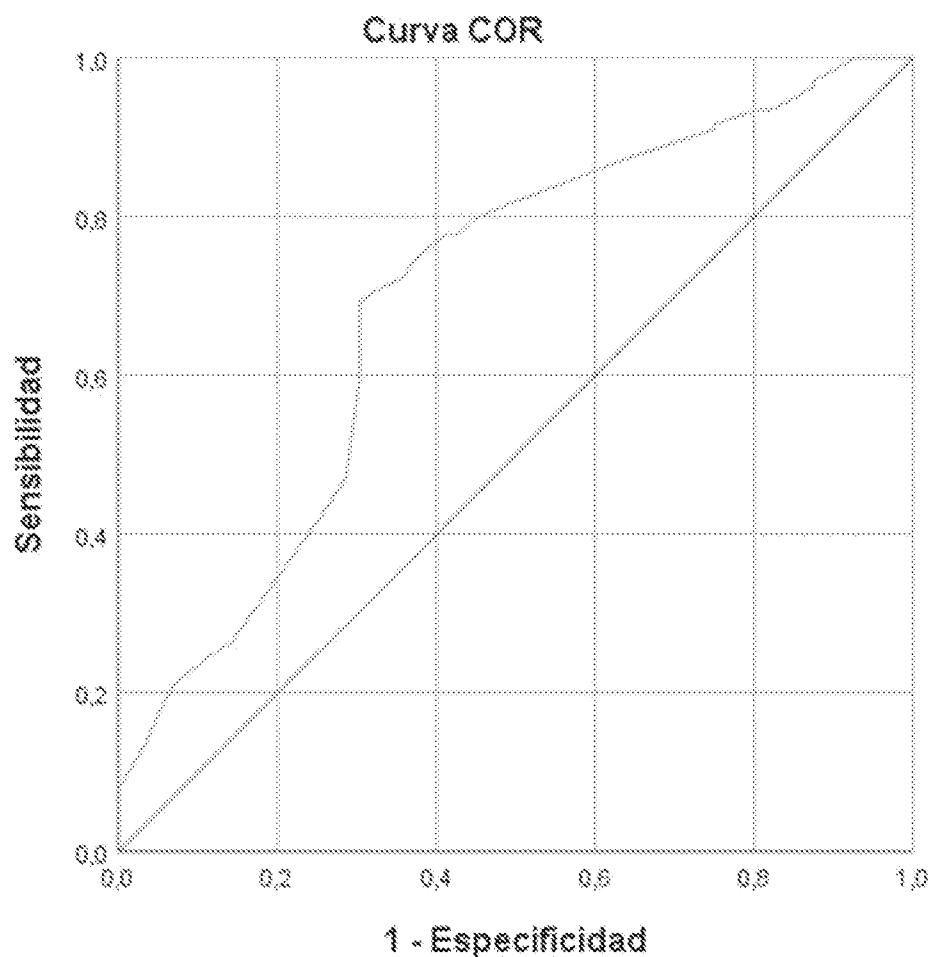


Fig. 8

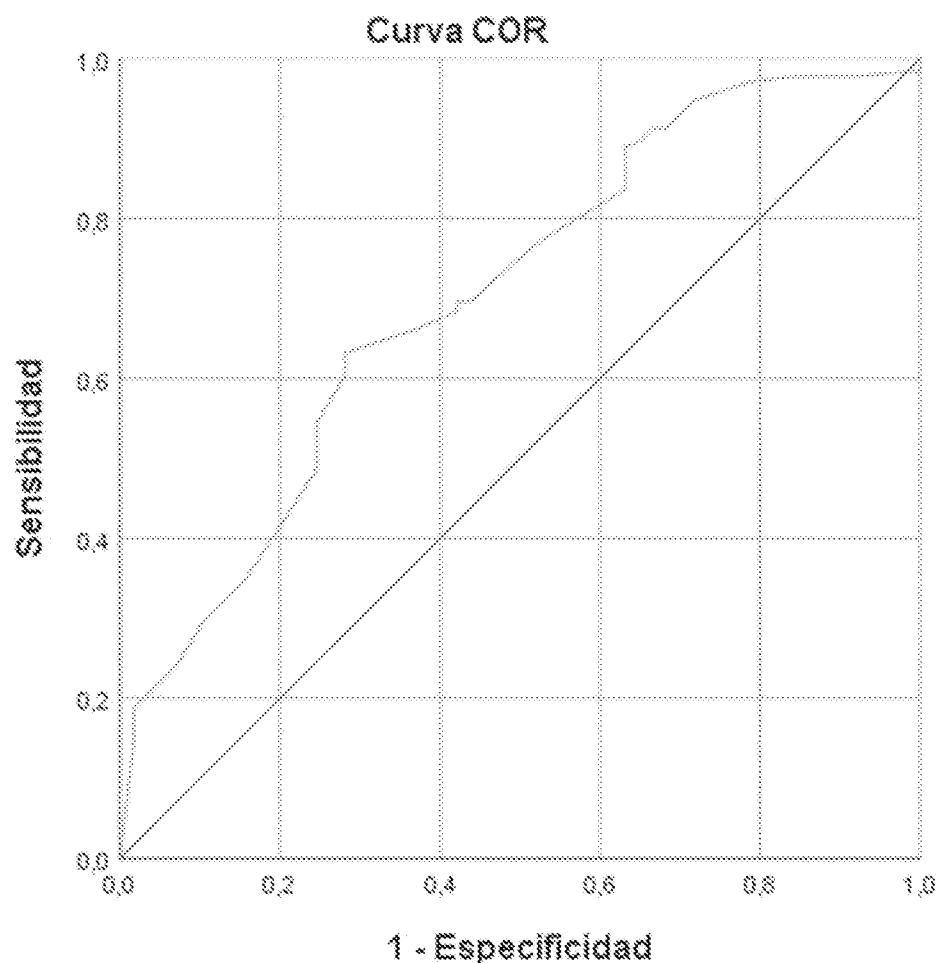


Fig. 9

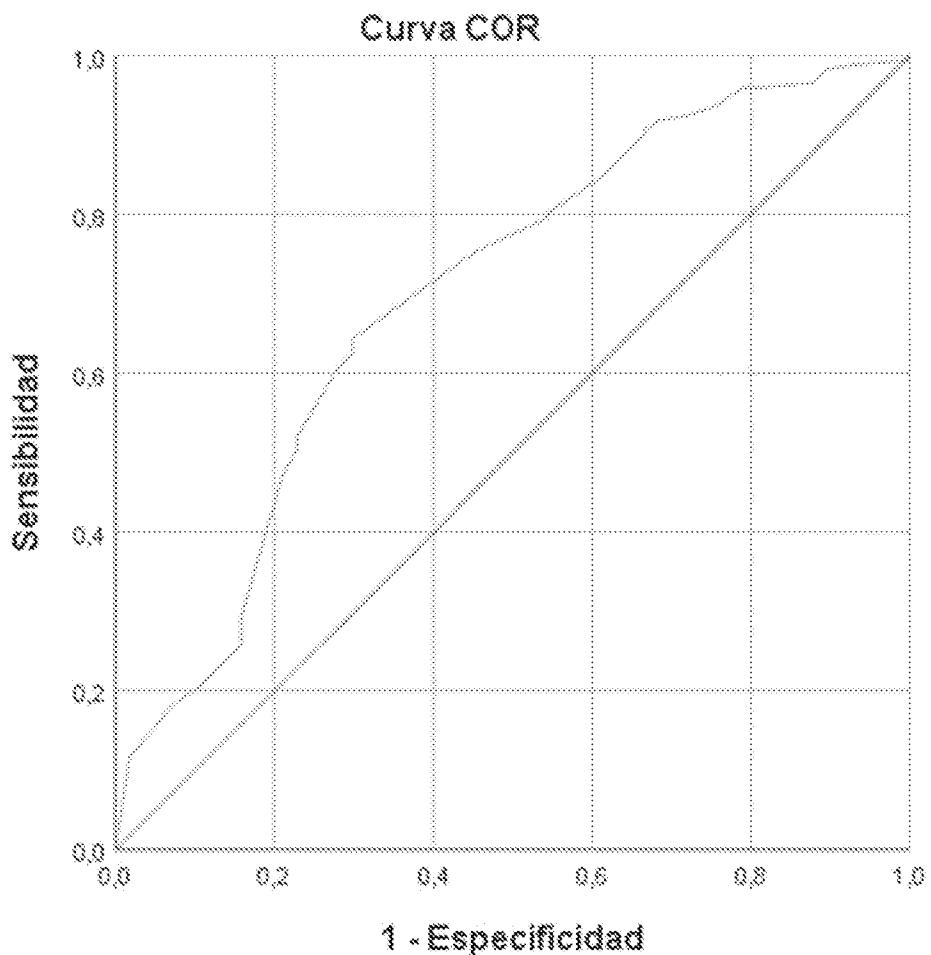


Fig.10

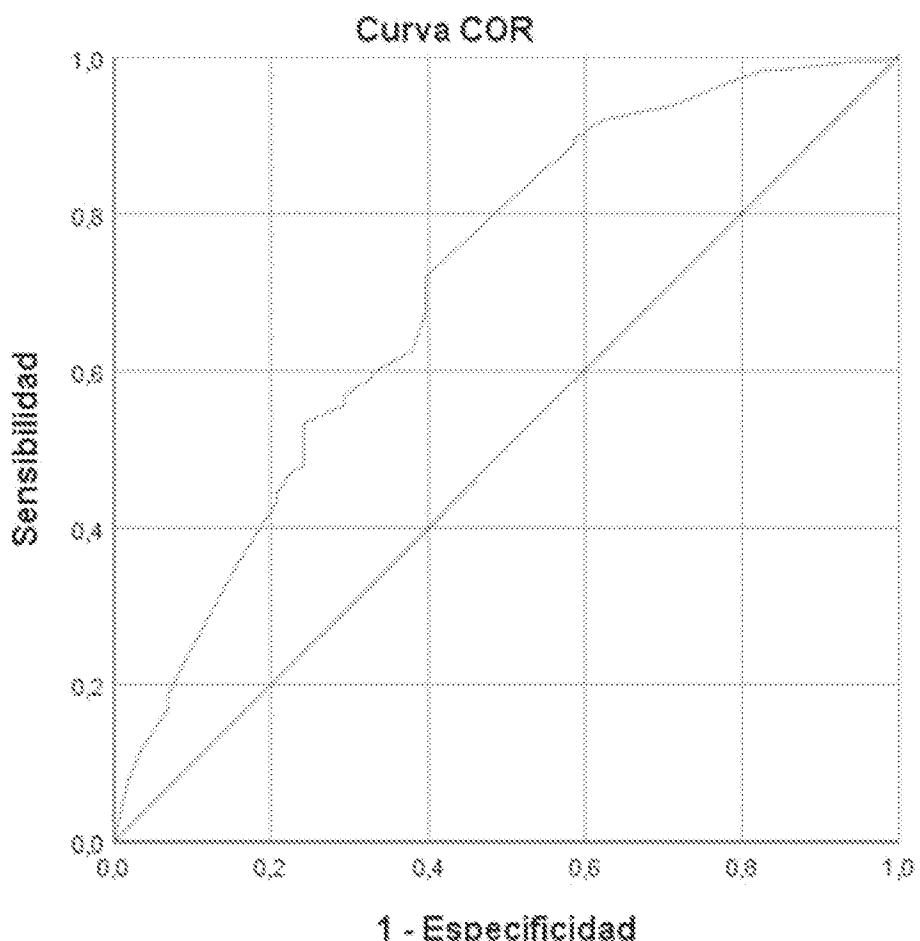


Fig. 11

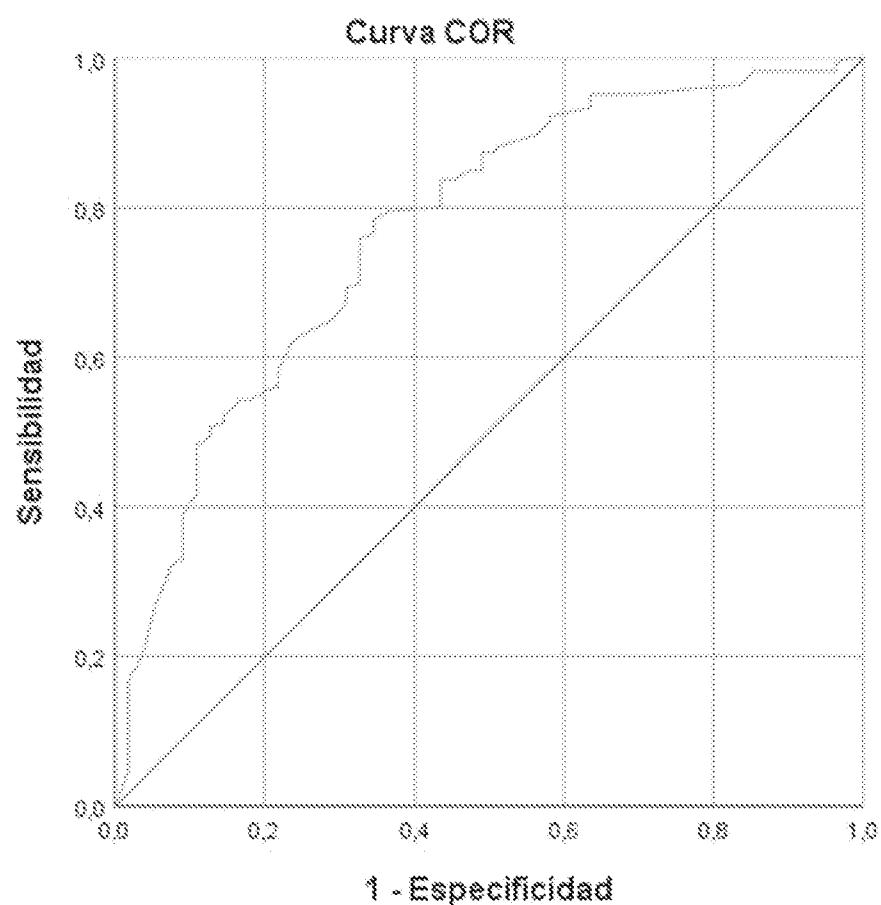


Fig. 12

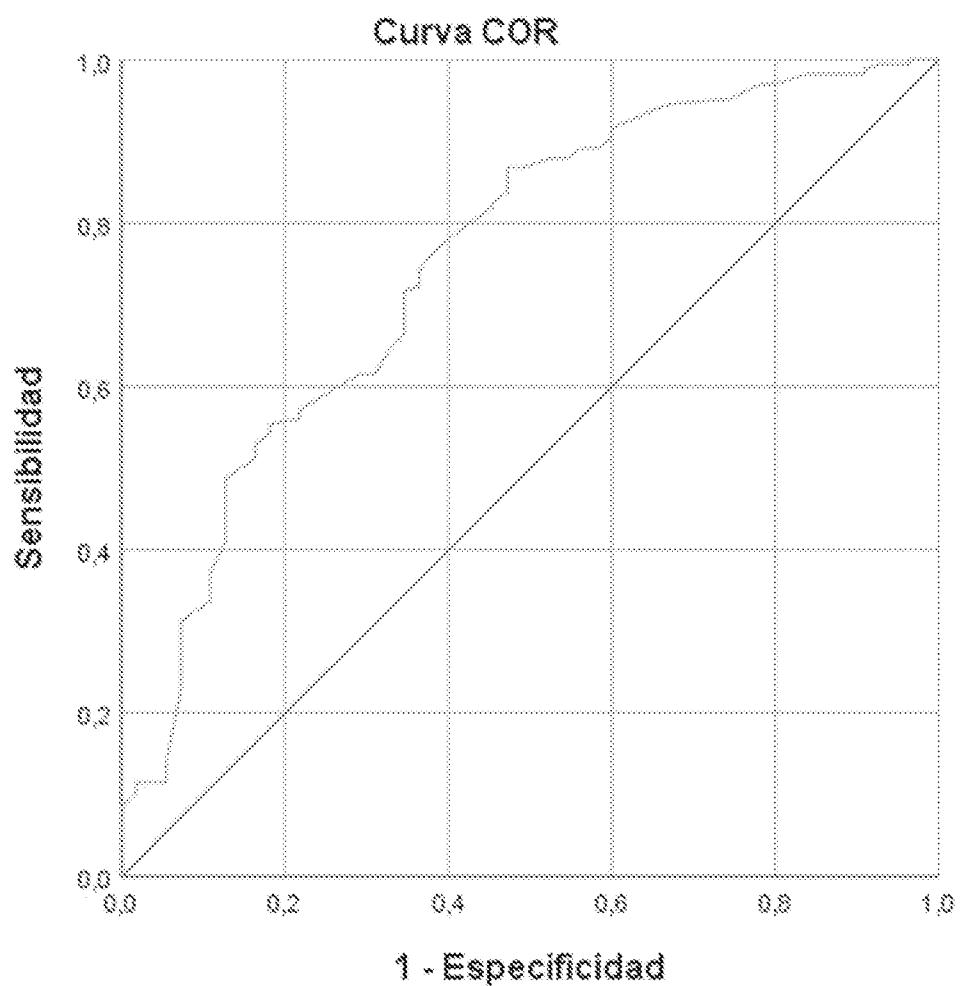


Fig. 13

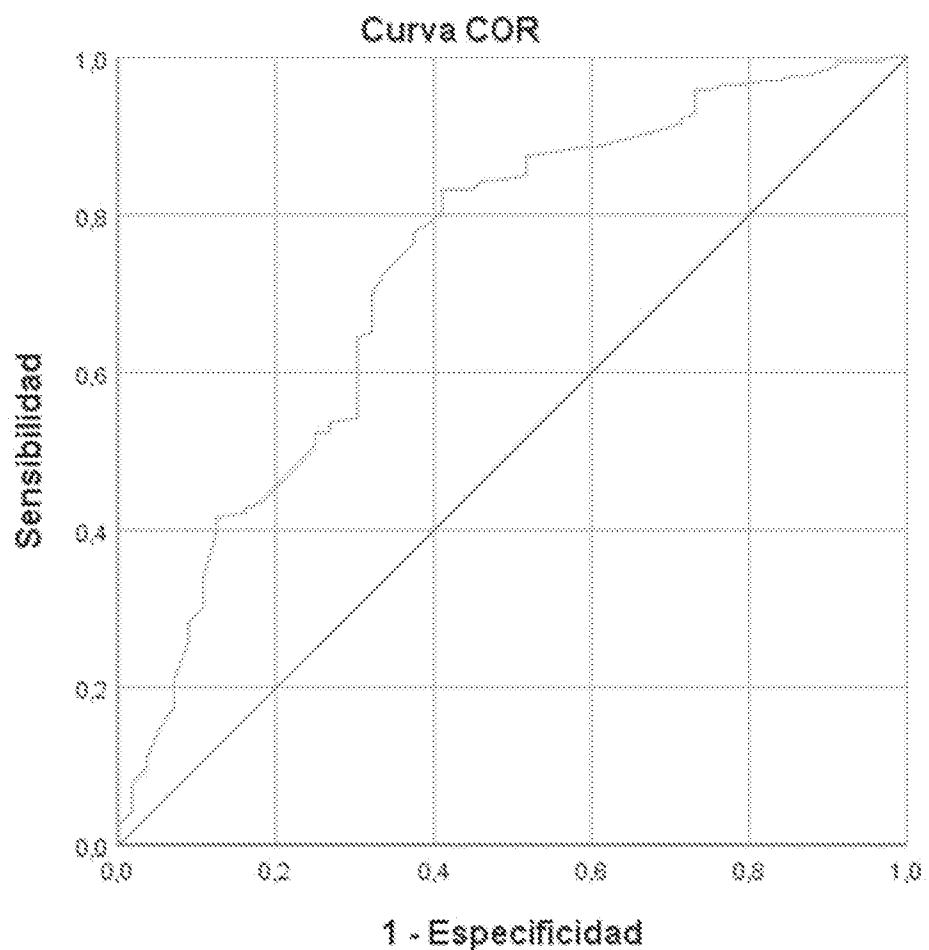


Fig. 14

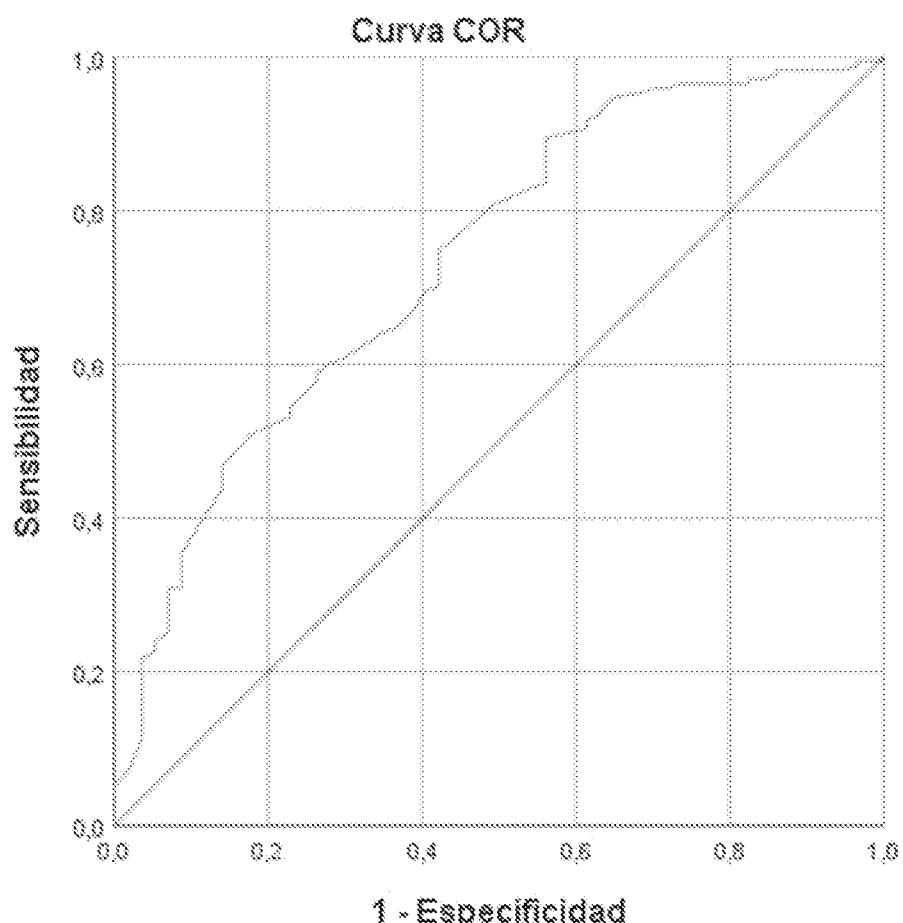


Fig. 15

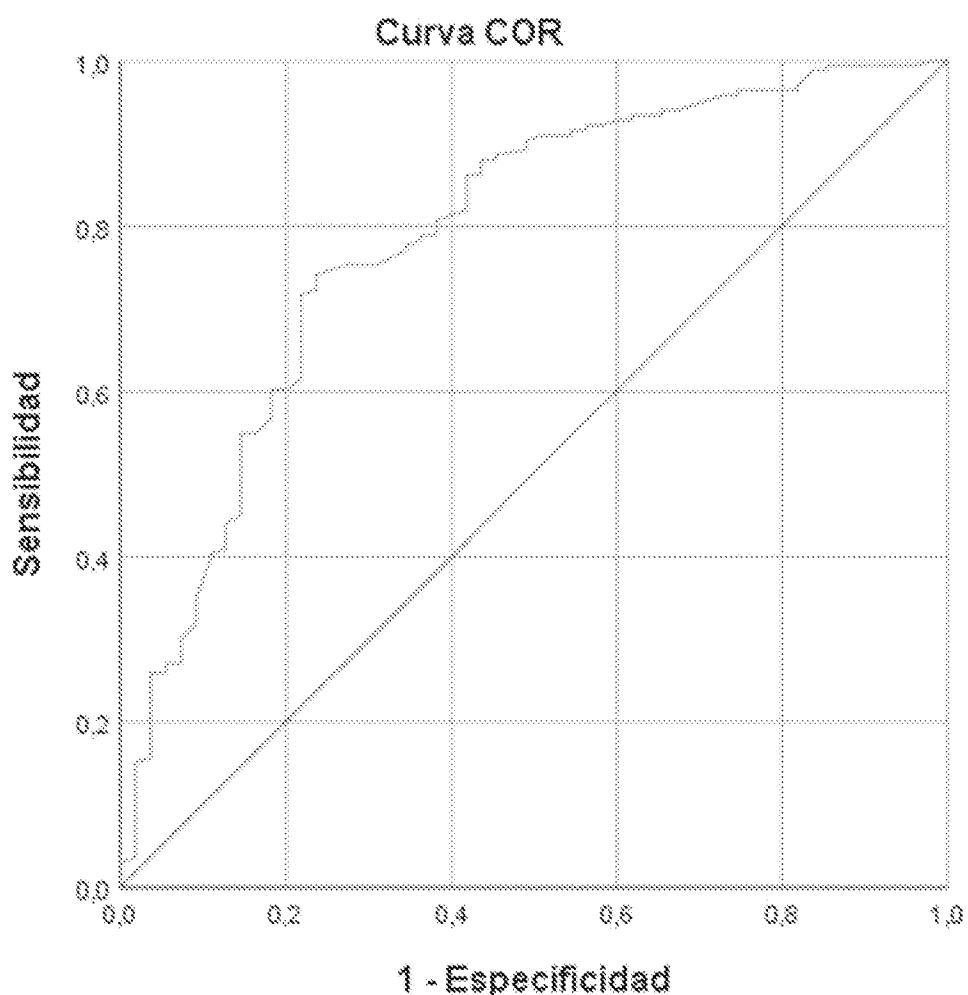


Fig. 16