(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
30 de agosto de 2018 (30.08.2018)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2018/154171 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
G01N 33/68 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2018/070139

(22) Fecha de presentación internacional:
23 de febrero de 2018 (23.02.2018)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201730251 24 de febrero de 2017 (24.02.2017) ES

(71) Solicitantes: **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD** [ES/ES]; Avda. de la Constitucion, 18, 41071 Sevilla (ES). **UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA** [ES/ES]; Avda. Medina Azahara, 5, 14071 Córdoba (ES).

(72) Inventores: **ORTEA GARCÍA, Ignacio**; Servicio Andaluz de Salud, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Edificio IMIBIC, Hospital Universitario Reina Sofía, Av. Menéndez Pidal, s/n, 14004 Córdoba (ES). **CAÑETE ESTRADA, Ramón**; Servicio Andaluz de Salud, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Edificio IMIBIC, Hospital Universitario Reina Sofía, Av. Menéndez Pidal, s/n, 14004 Córdoba (ES). **CABALLERO VILLARRASO, Javier**; Servicio Andaluz de Salud, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Edificio IMIBIC, Hospital Universitario Reina Sofía, Av. Menéndez Pidal, s/n, 14004 Córdoba (ES). **CAÑETE VÁZQUEZ, María Dolores**; Universidad de Córdoba, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Edificio IMIBIC, Hospital Universitario Reina Sofía, Av. Menéndez Pidal, s/n, 14004 Córdoba (ES).

(74) Mandatario: **FUSTER, Gustavo**; Paseo de la Castellana 140. Planta 3ª., Edificio Lima, 28046 Madrid (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:
— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*
— *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))*
— *con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))*

WO 2018/154171 A1

(54) **Title:** BIOMARKERS FOR DIAGNOSING GROWTH HORMONE DEFICIENCY, METHOD AND KIT

(54) **Título:** BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO DEL DÉFICIT DE HORMONA DEL CRECIMIENTO, PROCEDIMIENTO Y KIT

(57) **Abstract:** Biomarkers and early diagnostic method for diagnosing growth hormone deficiency in prepubescent childen, and/or a disease associated with growth hormone deficiency.

(57) **Resumen:** Biomarcadores y método de diagnóstico temprano del déficit de la hormona de crecimiento en niños prepúberes, y/o de una enfermedad asociada al déficit de hormona de crecimiento.

BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO DEL DÉFICIT DE HORMONA DEL CRECIMIENTO, PROCEDIMIENTO Y KIT.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención pertenece al campo de la Biología Molecular y la Biomedicina, y más concretamente, al campo de la endocrinología pediátrica y al diagnóstico temprano de déficit de hormona de crecimiento en niños prepúberes. El diagnóstico se lleva a cabo mediante el uso de biomarcadores cuyo nivel de abundancia y/o expresión se correlaciona con el déficit de hormona de crecimiento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Déficit de hormona de crecimiento en el niño

El **déficit de hormona de crecimiento (DGH)** en el niño, bien aislado o asociado a otras deficiencias hormonales, es una afección de naturaleza congénita o adquirida que se caracteriza por la ausencia parcial o total de la citada hormona, detectable en plasma o suero (Cañete y Gil. 2009. En: Tratado de Endocrinología Pediátrica, 4ª ed, 284-297).

Este síndrome se caracteriza por una combinación de anormalidades auxológicas, clínicas, bioquímicas y metabólicas causadas por una secreción anormal de hormona del crecimiento (GH) con la consecuente reducción en la generación de las hormonas y los factores de crecimiento que dependen de ella (Argente et al. 2001 J. Pediatr. Endrocrinol. Metab. 14, 1003-1008).

El hipopituitarismo idiopático, de etiología desconocida, es la forma más común, que puede tener carácter familiar o esporádico y cuya deficiencia de secreción de GH puede oscilar de un grado moderado a severo.

No hay un único dato clínico que defina el déficit de GH. La auxología por sí misma no define a este síndrome, pero orienta al médico a su diagnóstico.

Los criterios seguidos para el diagnóstico del déficit de GH son: talla baja mayor de 2 desviaciones típicas sobre la población de referencia. Talla más de 1,5 desviaciones estándar por debajo de la talla diana. Velocidad de crecimiento al menos durante el último año de 1 desviación estándar por debajo de la media para edad cronológica. La edad ósea estimada mediante radiología de muñeca y mano izquierda menor de un año, al menos, respecto de la edad cronológica. Se realizan dos test de provocación de GH, con una semana de diferencia, con pico de GH menor de 7,3 ng/mL, medida mediante radioinmunoanálisis (RIA) con marcaje monoclonal. Se debe realizar cariotipo a las niñas que deberán tener fórmula 46, XX y

asimismo una resonancia magnética (RM) de hipotálamo-hipófisis que debe ser normal. Se deben determinar IGF-I e IGFBP3 y excluir otras causas de hipocrecimiento (Growth Hormone Research Society. 2000. J. Clin. Endocrinol. Metab. 85, 3990-3993).

Actualmente no hay disponible un parámetro individual de marcadores bioquímicos, o una combinación de ellos, que reúna todos los criterios de diagnóstico para un uso extendido, rentable y fiable. Por ello, hay una necesidad importante de biomarcadores sistémicos no agresivos, específicos para la deficiencia de hormona de crecimiento.

Acciones de la GH

La GH no actúa en un determinado órgano diana de forma específica, sino que sus acciones son ejercidas sobre todo el organismo, no sólo de forma endocrina, sino también auto y paracrina. Aunque su acción principal y más conocida es la promoción del crecimiento lineal, también interviene de forma endocrina en regulaciones metabólicas nutricionales y de forma auto y/o paracrina en procesos de proliferación y diferenciación celular. Por esta razón la GH es algo más que una hormona exclusivamente destinada al crecimiento somático.

Las acciones biológicas de la GH se pueden englobar en dos grupos: aquéllas de tipo directo que no necesitan mediadores y las que son indirectas y necesitan la mediación de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs). En general, las primeras son las que ejerce sobre el metabolismo lipídico, hidrocarbonato, proteico y otras. Su acción principal, la estimulación del crecimiento, se realiza fundamentalmente de forma indirecta, a través del IGF-I y otros factores de crecimiento GH dependientes.

Los efectos metabólicos se mantienen durante toda la vida. Estos están destinados a aportar energía a los tejidos durante el ayuno y el ejercicio, lo que favorece la utilización de ácidos grasos libres como combustible alternativo a la glucosa, disminuyendo la utilización de la misma. Además, estimula la síntesis proteica al incrementar la captación celular de aminoácidos y la transcripción genética de enzimas implicadas en la citada síntesis. También actúa sobre el metabolismo de las grasas, disminuyendo los niveles séricos de colesterol. Por último, tiene una acción mitogénica, por aumento de la síntesis de DNA (Ahmid et al. 2016. Endocr. Connect. 5, R1-R11).

Biomarcadores

Un biomarcador o marcador biológico es una característica que puede ser medida y evaluada objetivamente como un indicador de procesos biológicos fisiológicos, patológicos, o de respuesta farmacológica a una intervención terapéutica (Fong et al. 2012. Cancer J. 18, 530-538.).

Los estudios de biomarcadores relacionados con alteraciones de los niveles de hormona de

crecimiento son escasos. Métodos proteómicos se han utilizado para el descubrimiento de biomarcadores y la detección indirecta del posible abuso de GH en los deportistas, así como en cualquier fórmula de control antidopaje, especialmente cuando se combina con la detección de IGF-I, Fibronectina y el gen RAB31 (miembro de la familia del oncogén RAS) y la proteína RAB31 (Ding et al. 2011. Proteomics 11, 3565-3571; Kay y Creaser. 2010. Expert Rev. Proteomics 7, 185-188; Ferro et al. 2016. J. Pharm. Biomed. Anal. 128, 111-118). En pacientes con acromegalia sometidos a cirugía transesfenoidal, en una serie reducida de pacientes, mediante técnicas de proteómica se identificaron diversos biomarcadores séricos de actividad de la enfermedad en enfermos afectos de acromegalia, antes y después de la cirugía (Cruz-Topete et al. 2001. Eur. J. Endocrinol. 164, 157-167; Cruz-Topete et al. 2011, J. Clin. Endocrinol Metab. 96, 2089-2097). Estudios de las acciones de la GH sobre el proteoma de niños deficientes han permitido diferenciar según su respuesta al tratamiento entre niños con déficit de GH y niños con talla baja idiopática, así como la respuesta al tratamiento, pero no han establecido diferencias con grupos control de la misma edad y género sin esta patología. Sin embargo, los citados autores concluyen que se precisan ulteriores estudios para validar la posible relevancia clínica de sus hallazgos (Andersson et al. 2011. J. Proteomics 74, 89-100; Andersson et al. Proteome Sci. 7, 40). Además, estos estudios se centran en niños con estatura baja idiopática, tratados con GH, con escaso número de pacientes y sin grupos control (Decker et al. 2013. Clin. Endocrinol. (Oxf). 79, 675-682; Hellgren et al. 2008. Proteome Sci. 6, 35), destacando la identificación y validación de biomarcadores y dianas terapéuticas concernientes al impacto del tratamiento con GH recombinante en las vertientes metabólicas responsables del metabolismo energético (Heo et al. 2013. Proteomics 13, 1211-1219).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Un **primer aspecto** de la invención se refiere al uso de los genes, o de su producto de expresión, *FIBA, FHR4, APOA4, FINC, CXCL7, F13A, SAA2* y/o *APOC4,* o cualquiera de sus combinaciones, para la detección, diagnóstico, pronóstico y seguimiento del déficit de hormona de crecimiento (GH) y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, o para seguir la eficacia de un tratamiento para el déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH. El uso de dichos genes y/o proteínas puede ser simultáneo o puede elegirse cualquiera de los genes y/o proteínas o cualquiera de sus combinaciones. La determinación de los niveles de expresión de combinaciones de varios biomarcadores puede permitir mayor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de deficiencia de GH y/o enfermedad asociada al déficit de GH o puede permitir mejor diferenciación de déficit de GH de otras enfermedades que puedan tener biomarcadores similares o solapantes.

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a un método, de ahora en adelante primer

método de la invención, para la obtención de datos útiles para la detección, diagnóstico y pronóstico del déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, que comprende:

a) Cuantificar los niveles de expresión de *FIBA, FHR4, APOA4, FINC, CXCL7, F13A, SAA2* y/o *APOC4,* o cualquiera de sus combinaciones, en una muestra aislada de un individuo.

Se pueden cuantificar los niveles de expresión de todos los genes simultáneamente, o de cualquiera de los genes por separado, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida, el método de la invención comprende además:

b) Comparar los niveles obtenidos en el paso (a) con un valor de referencia, o con los niveles de expresión de *FIBA, FHR4, APOA4, FINC, CXCL7, F13A, SAA2* y/o *APOC4* obtenidos en una muestra de referencia.

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a un método de detección, diagnóstico y pronóstico del déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a) y (b) del primer método de la invención, y además comprende:

c) asignar los pacientes que presentan unos niveles de expresión de *FIBA, FHR4, APOA4, FINC, CXCL7, F13A, SAA2* y/o *APOC4* obtenidos en el paso (b) diferentes y estadísticamente significativos al valor de referencia o a los niveles de la muestra de referencia, al grupo de individuos con riesgo de padecer éficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, o al grupo de individuos que padecen déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH.

Valores diferentes y estadísticamente significativos implica que los niveles de expresión se consideran aumentados o disminuidos.

Según este método de la invención, el nivel de expresión se considera aumentado en donde la diferencia entre la muestra de ensayo y la muestra de referencia es al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más. Un descenso en la expresión con el valor de referencia se considera en donde la diferencia entre la muestra de ensayo y la muestra de referencia de al menos 0,9 veces, 0,75 veces, 0,2 veces, 0,1 veces, 0,05 veces, 0,025 veces, 0,02 veces, 0,01 veces, 0,005 veces o incluso menos.

Preferiblemente, los niveles de expresión medios de *FHR4*, *FINC* y *CXCL7* están al menos 5,5 (para *FHR4*), 3,5 (para *FINC*) y 3,0 (para *CXCL7*) veces más aumentados en la muestra del grupo de individuos con riesgo de padecer déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al

déficit de GH, o en el grupo de individuos que padecen déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, que en la muestra de referencia.

Más preferiblemente, los niveles de expresión medios de *FHR4*, *FINC* y *CXCL7* están al menos 5,99 (para *FHR4*), 3,75 (para *FINC*) y 3,30 (para *CXCL7*) veces más aumentados en la muestra del grupo de individuos con riesgo de padecer déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, o en el grupo de individuos que padecen déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, que en la muestra de referencia.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención los niveles de expresión medios de *FIBA*, *APOA4, F13A*, *SAA2*, y *APOC4* son al menos 18 (para *FIBA*), 3 (para *APOA4*), 1,5 (para *F13A*), 33 (para *SAA2*), y 4 (para *APOC4*) veces menores en las muestras del grupo de individuos con riesgo de padecer déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, o del grupo de individuos que padecen déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, que en la muestra de referencia.

En otra realización aún más preferida de este aspecto de la invención los niveles de expresión medios de *FIBA*, *APOA4, F13A*, *SAA2*, y *APOC4* son al menos 20 (para *FIBA*), 3,23 (para *APOA4*), 1,96 (para *F13A*), 33,33 (para *SAA2*), y 4,17 (para *APOC4*) veces menores en las muestras del grupo de individuos con riesgo de padecer déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, o del grupo de individuos que padecen déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, que en la muestra de referencia.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a un método de seguimiento de la evolución del déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, de ahora en adelante tercer método de la invención, que comprende los pasos (a) y (c) del segundo método de la invención, y además comprende:

d) repetir al menos dos veces la secuencia de pasos (a) – (c) en muestras obtenidas del mismo individuo según el paso (a), de manera no simultánea.

En otra realización preferida del método de la invención, los pasos (a), y/o (b) pueden ser total o parcialmente automatizados.

Un **quinto aspecto** de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo que comprende los elementos y/o reactivos necesarios para cuantificar los nivele de expresión de los genes *FIBA, FHR4, APOA4, FINC, CXCL7, F13A, SAA2* y/o *APOC4,* o cualquiera de sus combinaciones.

Un **sexto aspecto** de la invención se refiere a un microarray, de ahora en adelante microarray de la invención, que comprende oligonucleótidos o micro-arreglos de canal único diseñados a partir de una secuencia conocida o ARNm de los genes *FIBA, FHR4, APOA4, FINC, CXCL7,*

F13A, SAA2 y/o *APOC4*. Más preferiblemente las secuencias de los genes *FIBA, FHR4, APOA4, FINC, CXCL7, F13A, SAA2* y/o *APOC4* son las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO:XXX y SEQ ID NO:XXX, respectivamente, o secuencias aminoacídicas que presenten un grado de identidad con dichas secuencias aminoacídicas de, al menos del 85%, típicamente de, al menos del 90%, preferiblemente de, al menos del 95%, más preferiblemente de, al menos del 98%, aún más preferiblemente de, al menos del 99%.

Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere a un microarray de proteínas, de ahora en adelante microarray de proteínas de la invención, que comprende anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos frente a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: Xx o SEQ ID NO: XX o frente a secuencias nucleotídicas que presenten un grado de identidad con dichas secuencias nucleotídicas de, al menos del 85%, típicamente de, al menos del 90%, preferiblemente de, al menos del 95%, más preferiblemente de, al menos del 98%, aún más preferiblemente de, al menos del 99%.

Un **octavo aspecto** de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo de la invención, la micromatriz, o el microarray de la invención, para la obtención de datos útiles para ladetección, diagnóstico y pronóstico del déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH.

Un **noveno aspecto** de la invención se refiere a un programa de ordenador que comprende instrucciones de programa para hacer que un ordenador lleve a la práctica el procedimiento de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención.

Un **décimo aspecto** de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

Un **undécimo aspecto** de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Resumen del resultado de aplicar una combinación de tres algoritmos de clasificación de biomarcadores (*Random-Forest Boruta, SCAD-Support Vector Machine*, y análisis de predicción de microarrays) utilizando el paquete bootfs. Se representa la importancia de los biomarcadores para separar entre los dos grupos, enfermos y sanos. El tamaño del nodo representa la frecuencia de un biomarcador específico en 100 conjuntos de variables cruzadas. La anchura de las líneas de unión entre dos nodos son proporcionales a la co-ocurrencia en un mismo set de los nodos que une (Sonntag et al. 2014. Transl. Proteomics 2, 52-59).

Figura 2. Diagramas de caja (box-plot) para los ocho mejores biomarcadores donde se ve el cambio en los niveles de expresión. Se incluye el valor p derivado de la prueba estadística de Mann-Whitney para cada biomarcador, comprobándose que la diferencia entre los dos grupos, déficit de GH y sanos, es estadísticamente significativa (p-valor<0.001).

Figura 3. Análisis de curva ROC para el biomarcador *FIBA*, resumiendo la precisión del biomarcador en la detección de pacientes con déficit de GH. El área bajo la curva (AUC) es la sensibilidad media del biomarcador o combinación de biomarcadores. Un biomarcador con valores no predictivos tendría un AUC de 0.5, mientras que un biomarcador con habilidad perfecta para predecir la enfermedad tendría un AUC de 1.

Figura 4. Análisis de curva ROC para el biomarcador *FHR4*, resumiendo la precisión del biomarcador en la detección de pacientes con déficit de GH. El área bajo la curva (AUC) es la sensibilidad media del biomarcador o combinación de biomarcadores. Un biomarcador con valores no predictivos tendría un AUC de 0.5, mientras que un biomarcador con habilidad perfecta para predecir la enfermedad tendría un AUC de 1.

Figura 5. Análisis de curva ROC para el biomarcador *APOA4*, resumiendo la precisión del biomarcador en la detección de pacientes con déficit de GH. El área bajo la curva (AUC) es la sensibilidad media del biomarcador o combinación de biomarcadores. Un biomarcador con valores no predictivos tendría un AUC de 0.5, mientras que un biomarcador con habilidad perfecta para predecir la enfermedad tendría un AUC de 1.

Figura 6. Análisis de curva ROC para el biomarcador *FINC*, resumiendo la precisión del biomarcador en la detección de pacientes con déficit de GH. El área bajo la curva (AUC) es la sensibilidad media del biomarcador o combinación de biomarcadores. Un biomarcador con valores no predictivos tendría un AUC de 0.5, mientras que un biomarcador con habilidad perfecta para predecir la enfermedad tendría un AUC de 1.

Figura 7. Análisis de curva ROC para el biomarcador *CXCL7*, resumiendo la precisión del biomarcador en la detección de pacientes con déficit de GH. El área bajo la curva (AUC) es la sensibilidad media del biomarcador o combinación de biomarcadores. Un biomarcador con valores no predictivos tendría un AUC de 0.5, mientras que un biomarcador con habilidad perfecta para predecir la enfermedad tendría un AUC de 1.

Figura 8. Análisis de curva ROC para el biomarcador *F13A*, resumiendo la precisión del biomarcador en la detección de pacientes con déficit de GH. El área bajo la curva (AUC) es la sensibilidad media del biomarcador o combinación de biomarcadores. Un biomarcador con valores no predictivos tendría un AUC de 0.5, mientras que un biomarcador con habilidad perfecta para predecir la enfermedad tendría un AUC de 1.

Figura 9. Análisis de curva ROC para el biomarcador *SAA2*, resumiendo la precisión del

biomarcador en la detección de pacientes con déficit de GH. El área bajo la curva (AUC) es la sensibilidad media del biomarcador o combinación de biomarcadores. Un biomarcador con valores no predictivos tendría un AUC de 0.5, mientras que un biomarcador con habilidad perfecta para predecir la enfermedad tendría un AUC de 1.

Figura 10. Análisis de curva ROC para el biomarcador *APOC4*, resumiendo la precisión del biomarcador en la detección de pacientes con déficit de GH. El área bajo la curva (AUC) es la sensibilidad media del biomarcador o combinación de biomarcadores. Un biomarcador con valores no predictivos tendría un AUC de 0.5, mientras que un biomarcador con habilidad perfecta para predecir la enfermedad tendría un AUC de 1.

Figura 11. Análisis de curva ROC para la combinación de biomarcadores *FIBA* y FHR4, resumiendo la precisión de dicha combinación en la detección de pacientes con déficit de GH. El área bajo la curva (AUC) es la sensibilidad media del biomarcador o combinación de biomarcadores. Un biomarcador o combinación de biomarcadores con valores no predictivos tendría un AUC de 0.5, mientras que un biomarcador con habilidad perfecta para predecir la enfermedad tendría un AUC de 1.

Figura 12. Análisis de curva ROC para la combinación de biomarcadores *FIBA* y *APOA4*, resumiendo la precisión de dicha combinación en la detección de pacientes con déficit de GH. El área bajo la curva (AUC) es la sensibilidad media del biomarcador o combinación de biomarcadores. Un biomarcador o combinación de biomarcadores con valores no predictivos tendría un AUC de 0.5, mientras que un biomarcador con habilidad perfecta para predecir la enfermedad tendría un AUC de 1.

Figura 13. Análisis de curva ROC para la combinación de biomarcadores *FIBA* y *FINC*, resumiendo la precisión de dicha combinación en la detección de pacientes con déficit de GH. El área bajo la curva (AUC) es la sensibilidad media del biomarcador o combinación de biomarcadores. Un biomarcador o combinación de biomarcadores con valores no predictivos tendría un AUC de 0.5, mientras que un biomarcador con habilidad perfecta para predecir la enfermedad tendría un AUC de 1.

Figura 14. Análisis de curva ROC para la combinación de biomarcadores *FIBA* y *CXCL7*, resumiendo la precisión de dicha combinación en la detección de pacientes con déficit de GH. El área bajo la curva (AUC) es la sensibilidad media del biomarcador o combinación de biomarcadores. Un biomarcador o combinación de biomarcadores con valores no predictivos tendría un AUC de 0.5, mientras que un biomarcador con habilidad perfecta para predecir la enfermedad tendría un AUC de 1.

Figura 15. Análisis de curva ROC para la combinación de biomarcadores *FHR4* y *APOA4*, resumiendo la precisión de dicha combinación en la detección de pacientes con déficit de GH. El área bajo la curva (AUC) es la sensibilidad media del biomarcador o combinación de

biomarcadores. Un biomarcador o combinación de biomarcadores con valores no predictivos tendría un AUC de 0.5, mientras que un biomarcador con habilidad perfecta para predecir la enfermedad tendría un AUC de 1.

Figura 16. Análisis de curva ROC para la combinación de biomarcadores *FHR4* y *FINC*, resumiendo la precisión de dicha combinación en la detección de pacientes con déficit de GH. El área bajo la curva (AUC) es la sensibilidad media del biomarcador o combinación de biomarcadores. Un biomarcador o combinación de biomarcadores con valores no predictivos tendría un AUC de 0.5, mientras que un biomarcador con habilidad perfecta para predecir la enfermedad tendría un AUC de 1.

Figura 17. Análisis de curva ROC para la combinación de biomarcadores *FHR4* y CXCL7, resumiendo la precisión de dicha combinación en la detección de pacientes con déficit de GH. El área bajo la curva (AUC) es la sensibilidad media del biomarcador o combinación de biomarcadores. Un biomarcador o combinación de biomarcadores con valores no predictivos tendría un AUC de 0.5, mientras que un biomarcador con habilidad perfecta para predecir la enfermedad tendría un AUC de 1.

Figura 18. Análisis de curva ROC para la combinación de biomarcadores *APOA4* y *FINC*, resumiendo la precisión de dicha combinación en la detección de pacientes con déficit de GH. El área bajo la curva (AUC) es la sensibilidad media del biomarcador o combinación de biomarcadores. Un biomarcador o combinación de biomarcadores con valores no predictivos tendría un AUC de 0.5, mientras que un biomarcador con habilidad perfecta para predecir la enfermedad tendría un AUC de 1.

Figura 19. Análisis de curva ROC para la combinación de biomarcadores *APOA4* y *CXCL7*, resumiendo la precisión de dicha combinación en la detección de pacientes con déficit de GH. El área bajo la curva (AUC) es la sensibilidad media del biomarcador o combinación de biomarcadores. Un biomarcador o combinación de biomarcadores con valores no predictivos tendría un AUC de 0.5, mientras que un biomarcador con habilidad perfecta para predecir la enfermedad tendría un AUC de 1.

Figura 20. Análisis de curva ROC para la combinación de biomarcadores *FINC* y *CXCL7*, resumiendo la precisión de dicha combinación en la detección de pacientes con déficit de GH. El área bajo la curva (AUC) es la sensibilidad media del biomarcador o combinación de biomarcadores. Un biomarcador o combinación de biomarcadores con valores no predictivos tendría un AUC de 0.5, mientras que un biomarcador con habilidad perfecta para predecir la enfermedad tendría un AUC de 1.

Figura 21. Análisis de curva ROC para la combinación de biomarcadores *FIBA, FHR4* y *APOA4*, resumiendo la precisión de dicha combinación en la detección de pacientes con déficit de GH. El área bajo la curva (AUC) es la sensibilidad media del biomarcador o combinación de

biomarcadores. Un biomarcador o combinación de biomarcadores con valores no predictivos tendría un AUC de 0.5, mientras que un biomarcador con habilidad perfecta para predecir la enfermedad tendría un AUC de 1.

Figura 22. Análisis de curva ROC para la combinación de biomarcadores *FIBA, FHR4, APOA4* y *FINC*, resumiendo la precisión de dicha combinación en la detección de pacientes con déficit de GH. El área bajo la curva (AUC) es la sensibilidad media del biomarcador o combinación de biomarcadores. Un biomarcador o combinación de biomarcadores con valores no predictivos tendría un AUC de 0.5, mientras que un biomarcador con habilidad perfecta para predecir la enfermedad tendría un AUC de 1.

Figura 23. Análisis de curva ROC para la combinación de biomarcadores *FIBA, FHR4, APOA4, FINC* y *CXCL7*, resumiendo la precisión de dicha combinación en la detección de pacientes con déficit de GH. El área bajo la curva (AUC) es la sensibilidad media del biomarcador o combinación de biomarcadores. Un biomarcador o combinación de biomarcadores con valores no predictivos tendría un AUC de 0.5, mientras que un biomarcador con habilidad perfecta para predecir la enfermedad tendría un AUC de 1.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención han identificado biomarcadores en muestras de suero humano cuya expresión se correlaciona con la presencia de déficit de GH y/o enfermedad asociada al déficit de GH. En particular, los autores han identificado *FHR4, FINC y CXCL7* como proteínas cuyos niveles aumentan significativamente en las muestras de suero de pacientes con déficit de GH, *y FIBA, APOA4, F13A, SAA2* y *APOC4* como proteínas cuyos niveles disminuyen significativamente en las muestras de suero de pacientes con déficit de GH, cuando se comparan con muestras control.

Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere al uso de los genes, o de su producto de expresión, *FIBA, FHR4, APOA4, FINC, CXCL7, F13A, SAA2* y/o *APOC4,* o cualquiera de sus combinaciones, para la detección, diagnóstico, pronóstico y seguimiento del déficit de hormona de crecimiento (GH) y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, o para seguir la eficacia de un tratamiento para el déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH. El uso de dichos genes y/o proteínas puede ser simultáneo o puede elegirse cualquiera de los genes y/o proteínas o cualquiera de sus combinaciones. La determinación de los niveles de expresión de combinaciones de varios biomarcadores puede permitir mayor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de deficiencia de GH y/o enfermedad asociada al déficit de GH o puede permitir mejor diferenciación de déficit de GH de otras enfermedades que puedan tener biomarcadores similares o solapantes.

Descripción de los biomarcadores de la invención

El término "FIBA", como se usa aquí, se refiere al gen "cadena alfa del fibrinógeno" del inglés "*fibrinogen alpha chain*" y conocido de forma alternativa como FGA, correspondiente al polipéptido identificado mediante el número de acceso HGNC:3661, que está localizado en la región cromosómica 4q31.3. FIBA también se identifica mediante "Entrez GeneID: 2243" (actualizado el 9 de octubre de 2016). En una forma de realización particular, el producto de expresión de FIBA comprende la secuencia SEQ ID NO:1, identificada como UniProt P02671 (última modificación 5 de octubre, 2016. Versión 212) así como ortólogos, variantes, isoformas y fragmentos de dicho polipéptido, incluyendo la isoforma 2 (UniProt P02671-2) identificada en SEQ ID NO:2 de la presente invención.

En el contexto de la presente invención, FIBA se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en las secuencias SEQ ID NO:1 o 2, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de las secuencias SEQ ID NO:1 o 2,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con una de las secuencias polinucleotídicas de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con las secuencias SEQ ID NO:1 o 2, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína FIBA. Preferiblemente, aunque sin limitarnos, la secuencia nucleotídica es la SEQ ID NO: 13.

El término "FHR4", como se usa aquí, se refiere al gen "proteína 4 relacionada con factor H del complemento" del inglés "Complement factor H-related protein 4" y conocido de forma alternativa como CFHR4, CFHL4, FHR-4, correspondiente al polipéptido identificado mediante el número de acceso HGNC:16979, que está localizado en la región cromosómica 1q31.3. FHR4 también se identifica mediante "Entrez GeneID: 10877" (actualizado el 9 de octubre de 2016). En una forma de realización particular, el producto de expresión de FHR4 comprende la secuencia SEQ ID NO:3, identificada como UniProt Q92496 (última modificación 5 de octubre, 2016. Versión 135) así como ortólogos, variantes, isoformas y fragmentos de dicho polipéptido, incluyendo las isoformas 2 (UniProt Q92496-2) y 3 (UniProt Q92496-3) identificadas en SEQ ID NO:4 y 5 de la presente invención.

En el contexto de la presente invención, FHR4 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en las secuencias SEQ ID NO:3 o 4 o 5, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de las secuencias SEQ ID NO:3 o 4 o 5,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con una de las secuencias polinucleotídicas de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con las secuencias SEQ ID NO:3 o 4 o 5, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína FHR4. Preferiblemente, aunque sin limitarnos, la secuencia nucleotídica es la SEQ ID NO: 14.

El término "APOA4", como se usa aquí, se refiere al gen "apolipoproteína A-IV" o "apolipoproteína A4" del inglés "Apolipoprotein A-IV", correspondiente al polipéptido identificado mediante el número de acceso HGNC:602, que está localizado en la región cromosómica 11q23.3. APOA4 también se identifica mediante "Entrez GeneID: 337" (actualizado el 9 de octubre de 2016). En una forma de realización particular, el producto de expresión de APOA4 comprende la secuencia SEQ ID NO:6, identificada como UniProt P06727 (última modificación 5 de octubre, 2016. Versión 185) así como ortólogos, variantes, isoformas y fragmentos de dicho polipéptido.

En el contexto de la presente invención, APOA4 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la secuencia SEQ ID NO:6, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la secuencia SEQ ID NO:6,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencias polinucleotídicas de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un

98% o un 99% con la SEQ ID NO:6, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína APOA4. Preferiblemente, aunque sin limitarnos, la secuencia nucleotídica es la SEQ ID NO: 15.

El término "FINC", como se usa aquí, se refiere al gen "fibronectina" del inglés "fibronectin", o de forma alternativa "globulina insoluble en frío" del inglés "cold-insoluble globulin", y conocido de forma alternativa como FN1, FN, CIG, GFND2, LETS, MSF, correspondiente al polipéptido identificado mediante el número de acceso HGNC:3778, que está localizado en la región cromosómica 2q35. FINC también se identifica mediante "Entrez GeneID: 2335" (actualizado el 9 de octubre de 2016). En una forma de realización particular, el producto de expresión de FINC comprende la secuencia SEQ ID NO:7, identificada como UniProt P02751 (última modificación 5 de octubre, 2016. Versión 223) así como ortólogos, variantes, isoformas y fragmentos de dicho polipéptido.

En el contexto de la presente invención, FINC se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la secuencia SEQ ID NO:7, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la secuencia SEQ ID NO:7,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencias polinucleotídicas de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO:7, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína FINC. Preferiblemente, aunque sin limitarnos, la secuencia nucleotídica es la SEQ ID NO: 16.

El término "CXCL7", como se usa aquí, se refiere al gen "proteína básica plaquetaria" del inglés "platelet basic protein", o alternativamente "quimiocina 7 de motivo C-X-C" ("C-X-C motif chemokine 7"), "factor de crecimiento derivado de leucocito" ("leukocyte-derived growth factor"), "factor de crecimiento derivado de macrófago" ("macrophage-derived growth factor), "citocina B7 inducible pequeña" ("small-inducible cytokine B7"), y conocido de forma alternativa como PBP, LDGF, MDGF, PPBP, CTAP3, SCYB7, TGB1, THBGB1, correspondiente al polipéptido identificado mediante el número de acceso HGNC:9240, que está localizado en la región

cromosómica 4q13.3.

CXCL7 también se identifica mediante "Entrez GeneID: 5473" (actualizado el 9 de octubre de 2016). En una forma de realización particular, el producto de expresión de CXCL7 comprende la secuencia SEQ ID NO:8, identificada como UniProt P02775 (última modificación 7 de septiembre, 2016. Versión 180) así como ortólogos, variantes, isoformas y fragmentos de dicho polipéptido.

En el contexto de la presente invención, CXCL7 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la secuencia SEQ ID NO:8, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la secuencia SEQ ID NO:8,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencias polinucleotídicas de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO:8, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína CXCL7. Preferiblemente, aunque sin limitarnos, la secuencia nucleotídica es la SEQ ID NO: 17.

El término "F13A", como se usa aquí, se refiere al gen "cadena A del factor de coagulación XIII" del inglés "coagulation factor XIII A chain", y conocido de forma alternativa como F13A1, correspondiente al polipéptido identificado mediante el número de acceso HGNC:3531, que está localizado en la región cromosómica 6p25.1. F13A también se identifica mediante "Entrez GeneID: 2162" (actualizado el 9 de octubre de 2016). En una forma de realización particular, el producto de expresión de F13A comprende la secuencia SEQ ID NO:9, identificada como UniProt P00488 (última modificación 5 de octubre, 2016. Versión 205) así como ortólogos, variantes, isoformas y fragmentos de dicho polipéptido.

En el contexto de la presente invención, F13A se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la secuencia SEQ ID NO:9, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la secuencia SEQ ID NO:9,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencias polinucleotídicas de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO:9, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína F13A. Preferiblemente, aunque sin limitarnos, la secuencia nucleotídica es la SEQ ID NO: 18.

El término "SAA2", como se usa aquí, se refiere al gen "proteína A-2 amiloide del suero" del inglés "serum amyloid A-2 protein", correspondiente al polipéptido identificado mediante el número de acceso HGNC:10514, que está localizado en la región cromosómica 11p15.1. SAA2 también se identifica mediante "Entrez GeneID: 6289" (actualizado el 9 de octubre de 2016). En una forma de realización particular, el producto de expresión de SAA2 comprende la secuencia SEQ ID NO:10, identificada como UniProt P0DJI9 (última modificación 7 de septiembre, 2016. Versión 33) así como ortólogos, variantes, isoformas y fragmentos de dicho polipéptido, incluyendo la isoforma 2 (UniProt P0DJI9 -2) identificada en SEQ ID NO:11 de la presente invención.

En el contexto de la presente invención, SAA2 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en las secuencias SEQ ID NO:10 o 11, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de las secuencias SEQ ID NO:10 o 11,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con una de las secuencias polinucleotídicas de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con las secuencias SEQ ID NO:10 o 11, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína SAA2. Preferiblemente, aunque sin limitarnos, la secuencia nucleotídica es la SEQ ID NO: 19.

El término "APOC4", como se usa aquí, se refiere al gen "apolipoproteína C-IV" o

"apolipoproteína C4" del inglés "apolipoprotein C-IV" o "apolipoprotein C4", correspondiente al polipéptido identificado mediante el número de acceso HGNC:611, que está localizado en la región cromosómica 19q13.32. APOC4 también se identifica mediante "Entrez GeneID: 346" (actualizado el 9 de octubre de 2016). En una forma de realización particular, el producto de expresión de APOC4 comprende la secuencia SEQ ID NO:12, identificada como UniProt P55056 (última modificación 5 de octubre, 2016. Versión 130) así como ortólogos, variantes, isoformas y fragmentos de dicho polipéptido.

En el contexto de la presente invención, APOC4 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la secuencia SEQ ID NO:12, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la secuencia SEQ ID NO:12,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencias polinucleotídicas de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO:12, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína APOC4. Preferiblemente, aunque sin limitarnos, la secuencia nucleotídica es la SEQ ID NO: 20.

Métodos de la invención

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a un método, de ahora en adelante primer método de la invención, para la obtención de datos útiles para la detección, diagnóstico y pronóstico del déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, que comprende:

a) Cuantificar los niveles de expresión de *FIBA, FHR4, APOA4, FINC, CXCL7, F13A, SAA2* y/o *APOC4,* o cualquiera de sus combinaciones, en una muestra aislada de un individuo.

Se pueden cuantificar los niveles de expresión de todos los genes simultáneamente, o de cualquiera de los genes por separado, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida, el método de la invención comprende además:

b) Comparar los niveles obtenidos en el paso (a) con un valor de referencia, o con los

niveles de expresión de *FIBA, FHR4, APOA4, FINC, CXCL7, F13A, SAA2* y/o *APOC4* obtenidos en una muestra de referencia.

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a un método de detección, diagnóstico y pronóstico del déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a) y (b) del primer método de la invención, y además comprende:

c) asignar los pacientes que presentan unos niveles de expresión de *FIBA, FHR4, APOA4, FINC, CXCL7, F13A, SAA2* y/o *APOC4* obtenidos en el paso (b) diferentes y estadísticamente significativos al valor de referencia o a los niveles de la muestra de referencia, al grupo de individuos con riesgo de padecer déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, o al grupo de individuos que padecen déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH.

En particular, los autores han identificado *FHR4, FINC y CXCL7* como biomarcadores, en concreto proteínas, cuyos niveles **aumentan significativamente** en las muestras de suero de pacientes con déficit de GH, *y FIBA, APOA4, F13A, SAA2* y *APOC4* como proteínas cuyos niveles **disminuyen significativamente** en las muestras de suero de pacientes con déficit de GH, cuando se comparan con muestras control.

Por tanto, en una realización preferida de este aspecto, el segundo método de la invención comprende asignar los pacientes que presentan unos niveles de expresión de *FHR4, FINC y CXCL7* obtenidos en el paso (b) superiores y estadísticamente significativos al valor de referencia o a los niveles de la muestra de referencia, al grupo de individuos con riesgo de padecer déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, o al grupo de individuos que padecen déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH.

Valores diferentes y estadísticamente significativos implica que los niveles de expresión se consideran aumentados o disminuidos.

Según este método de la invención, el nivel de expresión se considera aumentado en donde la diferencia entre la muestra de ensayo y la muestra de referencia es al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más. Un descenso en la expresión con el valor de referencia se considera en donde la diferencia entre la muestra de ensayo y la muestra de referencia de al menos 0,9 veces, 0,75 veces, 0,2 veces, 0,1 veces, 0,05 veces, 0,025 veces, 0,02 veces, 0,01 veces, 0,005 veces o incluso menos

Los inventores de la presente invención han determinado que

- FHR4 se encuentra 5.99 veces más aumentada en la media del grupo déficit GH respecto a la media grupo control,
- FINC se encuentra 3.75 veces más aumentada en la media del grupo déficit GH respecto a la media grupo control, y
- CXCL7 se encuentra 3.30 veces más aumentada en la media del grupo déficit GH respecto a la media grupo control.

Por tanto, preferiblemente, los niveles de expresión medios de *FHR4*, *FINC* y *CXCL7* están al menos 5,5 (para *FHR4*), 3,5 (para *FINC*) y 3,0 (para *CXCL7*) veces más aumentados en la muestra del grupo de individuos con riesgo de padecer déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, o en el grupo de individuos que padecen déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, que en la muestra de referencia.

Más preferiblemente, los niveles de expresión medios de *FHR4*, *FINC* y *CXCL7* están al menos 5,99 (para *FHR4*), 3,75 (para *FINC*) y 3,30 (para *CXCL7*) veces más aumentados en la muestra del grupo de individuos con riesgo de padecer déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, o en el grupo de individuos que padecen déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, que en la muestra de referencia.

Los inventores de la presente invención también han determinado que

- FIBA se encuentra **0.05 veces** más aumentada en la media del grupo déficit GH respecto a la media grupo control, o lo que es lo mismo, 20 veces más aumentada en la media del grupo control respecto a la media grupo déficit GH
- APOA4 se encuentra **0.31 veces** más aumentada en la media del grupo déficit GH respecto a la media grupo control), o lo que es lo mismo, 3.23 veces más aumentada en la media del grupo control respecto a la media grupo déficit GH.
- F13A se encuentra **0.51 veces** más aumentada en la media del grupo déficit GH respecto a la media grupo control, o lo que es lo mismo, 1.96 veces más aumentada en la media del grupo control respecto a la media grupo déficit GH
- SAA2 se encuentra **0.03 veces** más aumentada en la media del grupo déficit GH respecto a la media grupo control, o lo que es lo mismo, 33.33 veces más aumentada en la media del grupo control respecto a la media grupo déficit GH
- APOC4 se encuentra **0.24 veces** más aumentada en la media del grupo déficit GH respecto a la media grupo control, o lo que es lo mismo, 4.17 veces más aumentada en la media del grupo control respecto a la media grupo déficit GH)

Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención los niveles de expresión

medios de *FIBA*, *APOA4, F13A*, *SAA2*, y *APOC4* son al menos 18 (para *FIBA*), 3 (para *APOA4*), 1,5 (para *F13A*), 33 (para *SAA2*), y 4 (para *APOC4*) veces menores en las muestras del grupo de individuos con riesgo de padecer déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, o del grupo de individuos que padecen déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, que en la muestra de referencia.

En otra realización aún más preferida de este aspecto de la invención los niveles de expresión medios de *FIBA*, *APOA4, F13A*, *SAA2*, y *APOC4* son al menos 20 (para *FIBA*), 3,23 (para *APOA4*), 1,96 (para *F13A*), 33,33 (para *SAA2*), y 4,17 (para *APOC4*) veces menores en las muestras del grupo de individuos con riesgo de padecer déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, o del grupo de individuos que padecen déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, que en la muestra de referencia.

En otra realización preferida de este aspecto, el segundo método de la invención comprende asignar los pacientes que presentan unos niveles de expresión de *FIBA, APOA4, F13A, SAA2* y *APOC4* obtenidos en el paso (b) inferiores y estadísticamente significativos al valor de referencia o a los niveles de la muestra de referencia, al grupo de individuos con riesgo de padecer déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, o al grupo de individuos que padecen déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a un método de seguimiento de la evolución del déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, de ahora en adelante tercer método de la invención, que comprende los pasos (a) y (c) del segundo método de la invención, y además comprende:

d) repetir al menos dos veces la secuencia de pasos (a) – (c) en muestras obtenidas del mismo individuo según el paso (a), de manera no simultánea.

En otra realización preferida del método de la invención, los pasos (a), y/o (b) pueden ser total o parcialmente automatizados.

En una realización preferida, los pasos (a), (b) (c) y/o (d) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados y/o computerizados, por ejemplo, por medio de un equipos robótico de dispensación de líquidos en el paso (a), un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (b), o la comparación computerizada en el paso (c).

La comparación descrita en el paso (c) del método de la invención puede ser realizada

manualmente o asistida por ordenador

Las cantidades de referencia adecuadas pueden ser determinadas por el método de la presente invención a partir de una o varias muestras de referencia que puede/n ser analizada/s, por ejemplo, simultánea o consecutivamente junto con la muestra biológica problema. Así, por ejemplo pero sin limitarnos, la/s muestra/s de referencia puede/n ser control/es negativo/s, esto es, las cantidades detectadas por el método de la invención en muestras que provienen de individuos clínicamente bien documentados y que no padecen la enfermedad o deficiencia.

Puede presentar dicho aumento o disminución de la cantidad de producto de expresión de cualquiera de los genes respectivos, o de todos ellos simultáneamente, o en cualquier combinación.

En una realización preferida de los métodos de la invención, la muestra biológica aislada de un individuo en el paso (a) es una muestra de un líquido biológico, y aún más preferiblemente suero o plasma.

La expresión de un biomarcador de la invención se puede evaluar mediante cualquiera de una amplia variedad de métodos bien conocidos por el experto en la materia para detectar la expresión de una molécula transcrita o su proteína correspondiente. Si los biomarcadores son moléculas de ácido nucleico, la expresión se puede detectar y/o cuantificar usando métodos de hibridación de ácidos nucleicos, métodos de transcripción inversa de ácidos nucleicos, métodos de amplificación de ácidos nucleicos y similares.

Así, en una forma de realización preferida, la expresión de un gen marcador se evalúa preparando ARNm/ADNc (es decir, un polinucleótido transcrito) de una muestra, y mediante la hibridación del ARNm/ADNc con un polinucleótido de referencia que es complementario a un polinucleótido que comprende el gen marcador, y/o fragmentos del mismo. El ADNc se puede, opcionalmente, amplificar usando cualquiera de varios métodos de la reacción en cadena de la polimerasa antes de la hibridación con el polinucleótido de referencia.

En una forma de realización preferida, los biomarcadores son polipéptidos, en cuyo caso la detección de la cantidad de expresión de cualquiera de los genes FIBA, FHR4, APOA4, FINC, CXCL7, F13A, SAA2 y APOC4 se realiza mediante un inmunoensayo.

El término "*inmunoensayo*", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier técnica analítica que se basa en la reacción de la conjugación de una anticuerpo con la muestra obtenida. Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: inmunoblot, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoanálisis (RIA), inmunohistoquímica o microarrays de proteína. En otra realización preferida, la detección de la In1-ghrelina y/o los productos peptídicos de la In1-ghrelina se

puede realizar mediante un radioinmunoanálisis.

El término "*anticuerpo*" tal como se emplea en la presente descripción, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con, por ejemplo, cualquiera de los biomarcadores de la invención. Ejemplos de fragmentos inmunológicamente activas, incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')2 que se pueden generar tratando el anticuerpo con una enzima tal y como la pepsina.

Los anticuerpos pueden ser policlonales (incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítopos distintos) o monoclonales (dirigidos contra un único determinante en el antígeno).

El anticuerpo monoclonal puede estar alterado bioquímicamente, por manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de fragmentos o porciones que no son necesarias para el reconocimiento del antígeno, como por ejemplo los productos peptídicos de los biomarcadores de la invención, y estando sustituidas por otras que confieren al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales.

El anticuerpo puede ser también recombinante, quimérico, humanizado, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores. Un "*anticuerpo o polipéptido recombinante*" (rAC) es un anticuerpo que ha sido producido en una célula hospedadora que ha sido transformada o transfectada con el ácido nucleico que codifica para el polipéptido o antígeno, o produce el polipéptido o antígeno como resultado de la recombinación homóloga.

En otra realización preferida, el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). El ELISA puede ser de varios tipos, bien conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, ELISA directo, ELISA indirecto o ELISA sándwich.

En otra forma de realización preferida, la expresión de uno o varios de los genes FIBA, FHR4, APOA4, FINC, CXCL7, F13A, SAA2 y APOC4 se evalúa usando un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo radiomarcado, marcado con cromóforo, marcado con fluoróforo, o marcado con un enzima), un derivado de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo conjugado con un sustrato o con la proteína o ligando de un par proteína-ligando (por ejemplo, biotina-estreptavidina), o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de cadena sencilla, el dominio hiervariable de un anticuerpo aislado, etc.) que se une específicamente al biomarcador.

En otra forma de realización preferida, los niveles de biomarcadores FIBA, FHR4, APOA4, FINC, CXCL7, F13A, SAA2 y APOC4 se evalúan en una muestra mediante técnicas de espectrometría de masas tales como MALDI-TOF, SELDI-TOF, cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-

MS), cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas (HPLC-MS), electroforesis capilar-espectrometría de masas (CE-MS), resonancia magnética nuclear, o espectrometría de masas en tándem (por ejemplo MS/MS, MS/MS/MS, ESI-MS/MS, LC-MS/MS, etc.).

En otra forma de realización preferida, los niveles de biomarcadores FIBA, FHR4, APOA4, FINC, CXCL7, F13A, SAA2 y APOC4 se evalúan en una muestra mediante matrices de captura, que emplean reactivos de captura de alta afinidad, tal como anticuerpos convencionales, dominios individuales, esqueletos construidos (como Affybodies (Affibody, Bromma, Suecia), Trinectins (Phylos, Lexington, EEUU), o Anticalins (Pieris Proteolab, Freising-Weihenstephan, Alemania), péptidos o aptámeros de ácidos nucleicos, para unirse y detectar ligandos diana específicos.

Un "*método diagnóstico*" (o "*método de diagnóstico*") se refiere a un procedimiento donde se examina o analiza a un paciente (o a una muestra obtenida del mismo) para obtener un conocimiento diferencial de una enfermedad a través de los signos y síntomas que la caracterizan. En breve, el término "*diagnóstico*" en la presente solicitud se refiere a la capacidad de discriminar entre pacientes que padecen déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, y pacientes que no padecen déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH. Esta discriminación tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es estadísticamente significativa puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, test de Student o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90 %, al menos del 95 %, al menos del 97 %, al menos del 98 % o al menos del 99 %. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0.1, de 0.05, de 0.01, de 0.005 o de 0.0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad de forma diferencial en al menos el 60 %, en al menos el 70 %, en al menos el 80 %, o en al menos el 90 % de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

Un "*método pronóstico*" (o "*método de pronóstico*") se refiere a un procedimiento donde, a partir de análisis clínicos, se identifica la enfermedad o dolencia, como déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, que sufre la persona y, a partir de las experiencias con otros pacientes aquejados por la misma enfermedad o dolencia, como déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, se predice cómo será el estado de salud del individuo en el futuro; es decir, la evolución de la enfermedad o dolencia en el tiempo. El término "*pronóstico*" en la presente invención también se refiere a la capacidad de detectar pacientes o

sujetos asintomáticos que presentan una alta probabilidad de padecer una enfermedad o dolencia, como déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, aun cuando en el momento del diagnóstico no presenten dichas patologías o manifestaciones evidentes de las mismas. Como entenderán los expertos en la materia, tal valoración, aunque se prefiere que sea, normalmente puede no ser correcta para el 100% de los sujetos que se va a pronosticar. El término, sin embargo, requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos se pueda identificarcomo que padecen la enfermedad o que tienen predisposición a la misma. Si una parte esestadísticamente significativa se puede determinar sin más por el experto en la materia usando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo,determinación de intervalos de confianza, determinación de valores p, prueba *t* de *Student*, prueba de *Mann-Whitney*, etc. Los intervalos de confianza preferidos son al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%. Los valores de p son, preferiblemente pero sin limitarse, 0,2, 0,1, 0,05.

El término "seguimiento de la evolución", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere, a la supervisión del desarrollo de la enfermedad, como por ejemplo, pero sin limitarse, la evaluación de la respuesta a un determinado tratamiento del déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH. Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, el seguimiento se realiza post-tratamiento.

El término "*no simultáneo*" tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a la adquisición de dos o más muestras de tejido, de sangre (que también incluye plasma y suero) o de orina donde existe un intervalo de tiempo entre la adquisición de las muestras que permite un seguimiento del déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH y/o pronóstico útil mediante la comparación entre las cantidades de ARNm y/o proteínas en las diferentes muestras.

Preferiblemente, el intervalo de tiempo es de entre 1 mes y 20 años, como por ejemplo de entre 1 mes y 10 años, 1 mes y 5 años o 1 mes y 1 año. Por ejemplo, el intervalo de tiempo entre la adquisición de muestras es de aproximadamente 1 mes. Por ejemplo, el intervalo de tiempo entre la adquisición de muestras es de aproximadamente 2 meses. Por ejemplo, el intervalo de tiempo entre la adquisición de muestras es de aproximadamente 3 meses. Por ejemplo, el intervalo de tiempo entre la adquisición de muestras es de aproximadamente 6 meses. Por ejemplo, el intervalo de tiempo entre la adquisición de muestras es de aproximadamente 1 año. Por ejemplo, el intervalo de tiempo entre la adquisición de muestras es de aproximadamente 1 año y medio. Por ejemplo, el intervalo de tiempo entre la adquisición de muestras es de aproximadamente 2 años. Por ejemplo, el intervalo de tiempo entre la adquisición de muestras es de aproximadamente 3 años. Por ejemplo, el intervalo de tiempo entre la adquisición de muestras es de aproximadamente 5 años.

El grado de identidad existente entre dos secuencias se puede determinar por métodos convencionales, por ejemplo, por medio de algoritmos estándar de alineamiento de secuencias que son conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo BLAST (Altschul S.F. et al. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10).

Una "muestra biológica", como se define aquí, es una pequeña parte de un sujeto, representativa del conjunto y puede estar constituido por una biopsia o una muestra de fluido corporal. Las biopsias son pequeñas piezas de tejido y pueden ser frescas, congeladas o fijas, como fijada con formalina y embebidas en parafina (*formalin- fixed and paraffin embedded* FFPE). Muestras de fluidos corporales puede ser sangre, plasma, suero, orina, esputo, líquido cefalorraquídeo, leche o muestras de fluido ductal y pueden asimismo ser frescos, congelados o fijadas. Las muestras se pueden extirpar quirúrgicamente, mediante extracción es decir, por agujas hipodérmicas o de otro tipo, por microdisección o captura láser. La muestra debe contener cualquier material biológico adecuado para detectar el biomarcador o biomarcadores deseado/s, por lo tanto, dicha muestra debe, comprender ventajosamente material de las células del sujeto.

Por lo tanto, en una realización preferida, la muestra es una muestra de fluido corporal tal como una muestra de plasma, suero y/o sangre.

Una "*muestra de plasma, suero y/o sangre*" se refiere a una muestra obtenida mediante un método no invasivo. Un ejemplo no limitante y conocido por un experto en la materia sería mediante la extracción de una muestra de sangre de un individuo usando una aguja. Si se quisiese obtener una muestra de plasma o suero, se procedería a la separación del plasma/suero de los otros componentes de la sangre mediante la centrifugación. La cantidad de biomarcadores de la invención puede ser analizada, por ejemplo, pero sin limitarse, en muestras de plasma, suero y/o sangre fresco o plasma, suero y/o sangre que ha sido congelado y después descongelado.

Una "*muestra de orina*" se refiere a una muestra obtenida mediante un método no invasivo. Un ejemplo no limitante y conocido por un experto en la materia sería mediante la colección de la orina de un individuo en un contenedor sellable. La cantidad de biomarcadores de la invención puede ser analizada, por ejemplo, pero sin limitarse, en muestras de orina fresca u orina que ha sido congelada y después descongelada.

En una realización particular, la muestra es una muestra de Los términos "*individuo*", "*paciente*" o "*sujeto*" se usan de manera intercambiable en la presente descripción, y no pretenden ser limitativos en ningún aspecto, pudiendo ser el "*individuo*", "*paciente*" o "*sujeto*" de cualquier edad, sexo y condición física.

Una "*muestra tisular*", "*muestra de tejido*" o "*muestra tisular/de tejido aislada*" incluye, pero sin limitarse, células y/o tejidos de un sujeto, obtenidos mediante cualquier método conocido por

un experto en la materia. La muestra de tejido puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, una biopsia o un aspirado por aguja fina. Preferiblemente, las células son células tumorales. Tal y como se ha descrito anteriormente, la muestra tisular es muestra tisular de vejiga y/o colon.

Tal y como se ha descrito anteriormente, la medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa, puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta, tal y como se ha señalado anteriormente en la presente descripción. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración de los productos de expresión, basada en una señal que se obtiene directamente de los productos de expresión, y que está correlacionada con el número de moléculas de dichos productos de expresión. Dicha señal -a la que también podemos referirnos como señal de intensidad- puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de dichos productos de expresión. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, "etiquetas" o productos de reacción enzimática).

Una "*muestra de referencia*" se refiere a una muestra similar obtenida de un sujeto o individuo (paciente) control que no presente la enfermedad o dolencia, tal y como el déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, que se pretende diagnosticar o pronosticar. La "*cantidad de referencia*" o "*nivel de referencia*" se refiere a la cantidad (o a los niveles) absoluta obtenida de la muestra de referencia. Una "*muestra de referencia*" puede también referirse a una muestra similar obtenida del mismo sujeto o individuo en un punto anterior en el tiempo.

Un "*valor de referencia*" se refiere al conjunto de valores que se emplean interpretar los resultados de las pruebas diagnósticas, pronósticas y/o de seguimiento en un sujeto o individuo (paciente). Por ejemplo, los valore de referencia para una prueba determinada se basan en los resultados de esa misma prueba en el 95% de la población sana. Los valores de referencia de una prueba pueden ser diferentes en distintos grupos de personas (por ejemplo, entre mujeres y hombres, o entre niños y adultos). También se puede denominar "*intervalo de referencia*", "*límite de referencia*", y "*límite normal*".

Kits y dispositivos de la invención

Un **quinto aspecto** de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo que comprende los elementos y/o reactivos necesarios para cuantificar los nivele de expresión de los genes *FIBA, FHR4, APOA4, FINC, CXCL7, F13A, SAA2* y/o *APOC4,* o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo de la invención

comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de cuantificar el producto de expresión de los biomarcadores de la invención, y donde:

- los cebadores o primers son secuencias de polinucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases, más preferiblemente de entre 15 y 25 pares de bases, aún más preferiblemente de entre 18 y 22 pares de bases, y aún mucho más preferiblemente de alrededor de 20 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la 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 y/o la SEQ ID NO: 20.

- las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 30 y 1100 pares de bases, más preferiblemente de entre 100 y 1000 pares de bases, y aún más preferiblemente de entre 150 y 500 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la 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 y/o la SEQ ID NO: 20.

- los anticuerpos son capaces de unirse específicamente a una región formada por cualquiera de las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 ó SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, y/o SEQ ID NO: 12.En otra realización preferida, el kit o dispositivo de la invención los cebadores o primers son secuencias de polinucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases, más preferiblemente de entre 15 y 25 pares de bases, aún más preferiblemente de entre 18 y 22 pares de bases, y aún mucho más preferiblemente de alrededor de 20 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la 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 y la SEQ ID NO: 20, simultáneamente.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, los cebadores, sondas o anticuerpos están modificados, por ejemplo, pero sin limitarnos, mediante un marcaje radiactivo o inmunológico.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, los oligonucleótidos presentan modificaciones en alguno de sus nucleótidos, como por ejemplo, pero sin limitarnos a, nucleótidos que tengan alguno de sus átomos con un isótopo radiactivo, normalmente 32P o tritio, nucleótidos marcados inmunológicamente, como por ejemplo con una molécula de

digoxigenina, y/o inmovilizadas en una membrana. Varias posibilidades son conocidas en el estado de la técnica.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el anticuerpo es humano, humanizado o sintético. En otra realización preferida, el anticuerpo es monoclonal y/o se encuentra marcado con un fluorocromo. Preferiblemente, el flurocromo se selecciona de la lista que comprende Fluoresceína (FITC), Tetrametilrodamina y derivados, Ficoeritrina (PE), PerCP, Cy5, Texas, aloficocianina, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo de la invención además comprende todos aquellos elementos necesarios para llevar a cabo un procedimiento PCR.

El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc.

En otra realización preferida de la invención, los niveles de expresión se determinan mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, y el kit de la invención comprende un espectrómetro de masas, un cromatógrafo, espectrómetro de RNM, o culquiera de sus combinaciones.

Por otro lado, el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.

Un **sexto aspecto** de la invención se refiere a un microarray, de ahora en adelante microarray de la invención, que comprende oligonucleótidos o micro-arreglos de canal único diseñados a partir de una secuencia conocida o ARNm de los genes *FIBA, FHR4, APOA4, FINC, CXCL7, F13A, SAA2* y/o *APOC4*. Más preferiblemente las secuencias de los genes *FIBA, FHR4, APOA4, FINC, CXCL7, F13A, SAA2* y/o *APOC4* son las secuencias nucleotídicas 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 y/o la SEQ ID NO: 20, respectivamente, o secuencias aminoacídicas que presenten un grado de identidad con dichas secuencias aminoacídicas de, al menos del 85%, típicamente de, al menos del 90%, preferiblemente de, al menos del 95%, más preferiblemente de, al menos del 98%, aún más preferiblemente de, al menos del 99%.

Así, por ejemplo, las secuencias de oligonucleótidos pueden ser construidas en la superficie un chip mediante el elongamiento secuencial de una cadena en crecimiento con un solo nucleótido utilizando fotolitografía. Así, los oligonucleótidos son anclados por el extremo 3' mediante un método de activación selectiva de nucleótidos, protegidos por un reactivo fotolábil, mediante la incidencia selectiva de luz a través de una fotomáscara. La fotomáscara puede ser física o

virtual.

Así, las sondas de oligonucleótidos pueden ser de entre 10 y 100 nucleótidos, más preferiblemente, de entre 20 y 70 nucleótidos, y aún más preferiblemente, de entre 24 y 20 nucleótidos.

La síntesis *in situ* sobre un soporte sólido (por ejemplo, vidrio), podría hacerse mediante tecnología chorro de tinta (ink-jet), lo que requiere sondas más largas. Los soportes podrían ser, pero sin limitarse a, filtros o membranas de NC o nylon (cargadas), silicio, o Portas de vidrio para microscopios cubiertos con aminosilanos, polilisina, aldehídos o epoxy. La sonda es cada una de las muestras del chip. El target es la muestra a analizar: ARN mensajero, ARN total, un fragmento de PCR, etc.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el microarray de la invención presenta oligonucleótidos modificados, como se han descrito anteriormente.

Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere a un microarray de proteínas, de ahora en adelante microarray de proteínas de la invención, que comprende anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos frente a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 ó SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, y/o SEQ ID NO: 12 o frente a secuencias nucleotídicas que presenten un grado de identidad con dichas secuencias nucleotídicas de, al menos del 85%, típicamente de, al menos del 90%, preferiblemente de, al menos del 95%, más preferiblemente de, al menos del 98%, aún más preferiblemente de, al menos del 99%.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el microarray de proteínas de la invención presenta anticuerpos modificados, como se han descrito anteriormente en el cuarto aspecto de la invención.

Un **octavo aspecto** de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo de la invención, la micromatriz, o el microarray de la invención, para la obtención de datos útiles para la detección, diagnóstico y pronóstico del déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH.

Un **noveno aspecto** de la invención se refiere a un programa de ordenador que comprende instrucciones de programa para hacer que un ordenador lleve a la práctica el procedimiento de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención.

En particular, la invención abarca programas de ordenador dispuestos sobre o dentro de una portadora. La portadora puede ser cualquier entidad o dispositivo capaz de soportar el programa. Cuando el programa va incorporado en una señal que puede ser transportada directamente por un cable u otro dispositivo o medio, la portadora puede estar constituida por dicho cable u otro dispositivo o medio. Como variante, la portadora podría ser un circuito integrado en el que va incluido el programa, estando el circuito integrado adaptado para

ejecutar, o para ser utilizado en la ejecución de, los procesos correspondientes.

Por ejemplo, los programas podrían estar incorporados en un medio de almacenamiento, como una memoria ROM, una memoria CD ROM o una memoria ROM de semiconductor, una memoria USB, o un soporte de grabación magnética, por ejemplo, un disco flexible o un disco duro. Alternativamente, los programas podrían estar soportados en una señal portadora transmisible. Por ejemplo, podría tratarse de una señal eléctrica u óptica que podría transportarse a través de cable eléctrico u óptico, por radio o por cualesquiera otros medios.

La invención se extiende también a programas de ordenador adaptados para que cualquier medio de procesamiento pueda llevar a la práctica los métodos de la invención. Tales programas pueden tener la forma de código fuente, código objeto, una fuente intermedia de código y código objeto, por ejemplo, como en forma parcialmente compilada, o en cualquier otra forma adecuada para uso en la puesta en práctica de los procesos según la invención. Los programas de ordenador también abarcan aplicaciones en la nube basadas en dicho procedimiento.

Un **décimo aspecto** de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

Un **undécimo aspecto** de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxirribonucleótidos (ADN ó DNA).

Una secuencia de ácido nucleico o polinucleótido puede comprender las cinco bases que aparecen biológicamente (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y/o bases distintas de las cinco que aparecen biológicamente. Estas bases pueden servir para distintos propósitos, por ejemplo, para estabilizar o desestabilizar la hibridación; para estimular o inhibir la degradación de la sonda; o como puntos de unión para restos detectables o restos de apantallamiento. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede contener uno o más restos de base modificados, no estándar, derivatizados, incluyendo, pero sin limitarse a, N6-metil-adenina, N6-terc-butil-bencil-adenina, imidazol, imidazoles sustituidos, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5- (carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5- carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo,beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6- isopenteniladenina,1- metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-

dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5 metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético, wybutoxosina, pesudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo (es decir, timina), éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, 2,6-diaminopurina, y 5-propinil pirimidina. Otros ejemplos de restos de bases modificados, no estándar, o derivatizados pueden encontrarse en las Patentes de EEUU Nos. 6.001.611; 5.955.589; 5.844.106; 5.789.562; 5.750.343; 5.728.525; y 5.679.785. Además, una secuencia de ácido nucleico o polinucleótido puede comprender uno o más restos de azúcares modificados incluyendo, pero sin limitarse a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y una hexosa.

Los términos "secuencia aminoacídica", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

En la presente invención se entiende por variante o fragmento biológicamente activo, aquellas variantes o fragmentos de los péptidos indicados que tienen un efecto fisiológico, metabólico o inmunológico igual, o

EJEMPLOS DE LA INVENCIÓN

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

En el estudio participaron 30 pacientes con edades entre los 7-11 años en estado pre-púber. Se establecieron dos grupos diferentes:

1) 15 pacientes con déficit de GH, sin signos clínicos ni analíticos de pubertad (estadio I de Tanner), sin patología de base y sin haber recibido tratamiento médico que pudiera interferir en los resultados analíticos en los 12 meses anteriores.
2) 15 pacientes sanos, como grupo control, en estado pre-púber y seleccionados tras descartar ausencia de patología.

Todos los pacientes con déficit de GH seleccionados fueron diagnosticados con deficiencia de GH en el Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, España) entre 2013 y 2015. Se registró toda la información de los pacientes, incluyendo género, edad, y manifestaciones clínicas. La edad media de los pacientes fue de 9.86±1.15 años (rango de 7.08 a 11.75 años) con un ratio

entre varones y mujeres de 8:7.

Muestras

Las muestras de sangre fueron recogidas después de obtener la aprobación de comités éticos relevantes (Comité de Ética e Investigación del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, miembro de la red de Comités de Ética del Sistema Sanitario Público de Andalucía) y consentimientos informados firmados adecuados. Se recogieron un total de 30 muestras de sangre de 3 mL cada una, usando los procedimientos estandarizados del Servicio de Pediatría del Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, España). Las muestras de sangre fueron obtenidas de pacientes diagnosticados con déficit de GH y también de individuos sanos. El suero fue obtenido después de la centrifugación de la sangre a 3000xg durante 10 minutos a 4ºC, tras lo cual las muestras fueron alicuotadas y almacenadas a -80ºC hasta su análisis.

Depleción de proteínas mayoritarias en suero

Las siete proteínas más abundantes en suero (albúmina, IgG, antitripsina, IgA, transferrina, haptoglobulina y fibrinógeno) fueron deplecionadas en cada muestra utilizando el kit *Hu-7 Multiple Affinity Removal System* (Agilent Technologies, Wilmington, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras ello, las proteínas fueron concentradas utilizando concentradores por centrifugación de 5000 Da (Agilent Technologies) y precipitadas con ácido tricloroacético y acetona. Los pellets, conteniendo las proteínas precipitadas, fueron resuspendidas en el detergente RapiGest SF (Waters, Milford, EEUU) al 0.2% en bicarbonato amónico 50 mM.

Digestión con tripsina

Tras cuantificar la proteína total en cada muestra, 50 µg de proteína total de cada muestra se sometió a digestión con tripsina siguiendo el protocolo publicado en Vowinckel et al. 2014 (F1000 Research 2, 272). Las muestras proteicas se incubaron con ditiotreitol 5mM durante 30 minutos a 60ºC, y luego con iodoacetamida 10mM durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras ello, se añadió tripsina modificada Sequencing Grade (Promega, Madison, EEUU) en ratio 1:40 (tripsina:proteína) y se incubó a 37ºC durante 2 horas. A continuación se añadió tripsina de nuevo, en el mismo ratio, y se incubó a 37ºC durante 15 horas. Tras la incubación, el detergente RapiGest SF se precipitó por centrifugación después de incubar a 37ºC con ácido trifluoroacético al 0.5%. El volumen final de cada muestra se ajustó con agua MilliQ y con acetonitrilo para una concentración final de 0.5 µg péptido por µL de muestra, 2.25% de acetonitrilo y 0.2% de ácido trifluoroacético.

Generación de librería de espectros de masas

Entre la variedad de tecnologías proteómicas utilizadas en los estudios de biomarcadores, las estrategias de adquisición independiente de datos (data independent acquisition, DIA) (Venable et al. 2004. Nat. Methods 1, 39–45) y las de SRM (selected reaction monitoring) (Picotti y Aebersold. 2012. Nat. Methods 9, 555–566) han adquirido gran potencial y por ello están siendo muy utilizadas. Una variedad de los métodos DIA denominada SWATH (Sequential Window Acquisition of all THeoretical Mass Spectra) (Gillet et al. 2012. Mol. Cell. Proteomics 11, O111.016717) ha demostrado una excelente precisión y exactitud en la cuantificación de proteínas, equivalente a las alcanzadas utilizando el método SRM incluso cuando se utiliza para la cuantificación de proteomas completos (Huang et al. 2015. Proteomics 15, 1215–1223; Selevsek et al. 2015. Mol. Cell. Proteomics 14, 739–749). SWATH puede describirse como un método en el que se combinan datos de los iones precursores de los péptidos adquiridos en scans MS1 por una parte, y por otra datos de los fragmentos de los péptidos adquiridos en scans sucesivos MS2 en los que se aíslan y fragmentan precursores de relación masa/carga (*m/z*) de rango creciente. Los datos adquiridos de esta manera se relacionan entonces con péptidos y proteínas concretos utilizando una librería de espectros de masas, de forma que los cromatogramas de los fragmentos peptídicos pueden ser extraídos *in-silico* y utilizados para cuantificar las proteínas a las que corresponden. SWATH es una técnica innovadora de espectrometría de masas que monitoriza todos los péptidos y proteínas detectables de una muestra en una sola carrera. Por tanto, la gran ventaja de la adquisición SWATH respecto al SRM es su potencial para monitorizar y cuantificar un número mucho mayor de transiciones (y por tanto péptidos y proteínas) al mismo tiempo.

Para la construcción de la librería de espectros, las muestras ya digeridas fueron analizadas mediante nanocromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (nLC-MS/MS). Para ello, 2 µL de cada muestra, equivalentes a 1 µg de proteína digerida, se inyectó en un nanocromatógrafo líquido (Ekspert nLC415, Eksigent, Dublin, EEUU) utilizando para la separación cromatográfica una columna Acclaim PepMap 100 C18 (75 µm x 25 cm, 3 µm, 100 Å) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EEUU) y un gradiente de los solventes A (agua con 0.1% de ácido fórmico) y B (acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) consistente en el paso del 5% de B al 30% de B en 120 minutos, y luego al 95% de B en otros 10 minutos, con un flujo de 300 nL/minuto. La cromatografía se acopló on-line a un espectrómetro de masas de alta resolución híbrido cuadrupolo-TOF (Triple TOF 5600+, Sciex, Redwood City, EEUU) utilizando una interfase NanoSpray III ESI (Sciex) aplicando 2600 voltios. Así, el eluyente de la cromatografía se analizó por espectrometría de masas con un método de adquisición dependiente de datos (data-dependent acquisition, DDA) top 50 en modo ion positivo, consistente en la adquisición cíclica de un scan MS (adquirido durante 250 milisegundos, en el

rango 350-1250 m/z) y del scan MS2 (adquirido durante 60 milisegundos, en el rango 230-1700 m/z) de los 65 precursores más intensos encontrados en el scan MS previo. Los iones precursores fragmentados en cada ciclo se añadieron a una lista de exclusión durante 15 segundos, y los iones monocarga fueron excluídos.

La identificación de los péptidos y proteínas presentes en las muestras se realizó enfrentando los datos de las carreras de nLC-MS/MS con una base de datos Swiss-Prot de proteínas humanas, concatenada real/reversa y descargada en marzo de 2016. Para ello se utilizó el motor de búsqueda Protein Pilot versión 5.0.1 (Sciex), especificando iodoacetamida como alquilación de cisteínas. El False Discovery Rate (FDR) se fijó en el 1% para péptidos y proteínas. Los espectros MS/MS de los péptidos identificados se utilizaron para generar la librería espectral necesaria para la posterior cuantificación con la técnica SWATH, utilizando el programa Peakview versión 2.1 (Sciex). Sólo se incluyeron en la librería de espectros los péptidos con valor de confidencia otorgado por Protein Pilot por encima del 99%.

Cuantificación proteica por espectrometría de masas SWATH

Para las carreras SWATH, de las que se extraerá la información cuantitativa de las proteínas, 2 µL (1 µg de proteína digerida) de las muestras digeridas fueron analizadas mediante nLC-MS/MS utilizando el mismo equipamiento, gradiente cromatográfico y flujo que los descritos anteriormente para las carreras DDA utilizadas para construir la librería de espectros, pero utilizando en el espectrómetro de masas un método de adquisición DIA SWATH. Dicha adquisición consistió en la adquisición cíclica de un scan de MS (adquirido durante 50 milisegundos, en el rango 400-1250 m/z) seguido de 50 scans MS2 (adquiridos durante 96 milisegundos en el rango 230-1500 m/z) en los que se fragmentan todos los precursores aislados en ventanas secuenciales de m/z solapantes (1 m/z de solapamiento). Las ventanas secuenciales de aislamiento de precursores a fraccionar cubrieron el rango de m/z 400-1250, con anchuras de ventana variable que fueron optimizadas evaluando en las carreras DDA previas la densidad de iones en función del m/z de cada ion. Utilizar ventanas de aislamiento de precursores de anchura de m/z variable en función de la densidad de iones en cada rango de m/z mejora la identificación y cuantificación de péptidos y proteínas (Zhang et al. 2015. J. Proteome Res. 14, 4359-71.).

La extracción de datos específica de las diferentes carreras SWATH se realizó con el programa Peakview versión 2.1 (Sciex), con el módulo MS/MS^{ALL} with SWATH Acquisition MicroApp versión 2.0. Esta aplicación procesó los datos utilizando la biblioteca espectral creada previamente a las carreras SWATH. Los tiempos de retención de los péptidos que serán seleccionados para cada proteína se calibran utilizando los péptidos del kit iRT kit (Biognosys AG, Schlieren/Zürich, Suiza) que se añaden en cada muestra y eluyen a lo largo de todo el

cromatograma; los cromatogramas de los iones extraídos se generaron para cada ión fragmento seleccionado. Peakview calcula una puntuación y un FDR (False Discovery Rate) para cada péptido asignado usando componentes cromatográficos y de los espectros; sólo los péptidos con un FDR de menos del 5% se utilizan para la cuantificación de proteínas. Peakview calcula los valores de abundancia de los péptidos mediante la suma de las áreas bajo pico de los fragmentos peptídicos correspondientes; la cuantificación de proteínas se calcula sumando los valores de abundancia de los péptidos correspondientes.

Para calcular la abundancia diferencial entre las distintas condiciones, se utilizó el programa MarkerView versión 1.2.1 (Sciex), que normaliza las señales y calcula un valor de tasa de cambio (*fold change*) entre las dos condiciones para cada proteína.

Análisis estadístico y algoritmos de selección de marcadores

Para seleccionar los biomarcadores que mejor clasifican entre los individuos con déficit de GH y los controles sanos, se aplicó una combinación de tres algoritmos de clasificación diferentes utilizando el paquete bootfs (Sonntag et al. 2014. Transl. Proteomics 2, 52-59) en el entorno del software estadístico R versión 3.2.3. Los tres algoritmos utilizados fueron RF-Boruta (random forests con el algoritmo Boruta para selección de características) (Kursa y Rudnicki, 2010. J. Stat. Softw. 36, 1-13), SCAD-SVM (support vector machines usando penalización "smoothly clipped absolute deviation") (Zhanh et al. 2006. Bioinformatics 22, 88-95) y PAM (análisis de predicción de microarrays con clasificador centroide contraído más cercano) (Tibshirani et al. 2002. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 6567-6572).

Estos algoritmos utilizan los valores de abundancia de cada proteína en cada muestra analizada para ordenar dichas proteínas en función de su "importancia" o capacidad de clasificar entre las dos condiciones, enfermos y sanos. En función de dicha clasificación, para las primeras proteínas clasificadas y sus combinaciones se construyeron curvas de la característica operativa del receptor (curvas ROC) y se calculó el área bajo curva (area under curve, AUC) como valor indicativo de su significancia diagnóstica representando la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) frente a la tasa de falsos positivos (1-especificidad). De esta forma se obtuvo el mínimo número de proteínas que permite la mejor clasificación posible, esto es, que clasifica entre enfermos y sanos con un 100% de sensibilidad y de especificidad. Adicionalmente, se representaron diagramas de caja que muestran los cambios de expresión de aquellos biomarcadores seleccionados en función del resultado del ranking. Además, como los valores de abundancia de las proteínas no presentaron una distribución normal, se utilizó el test de Mann-Whitney para destacar las diferencias entre los dos grupos ($p<0.05$).

RESULTADOS

Como resultado de la identificación masiva de proteínas en las muestras de suero a partir de las carreras DDA, un total de 297 proteínas y 9214 péptidos fueron identificados con un FDR< 1%. Los espectros MS/MS identificados fueron utilizados para construir una librería de espectros, que contuvo en total 286 proteínas.

Las trazas cromatográficas de los iones fragmento se extrajeron de las carreras SWATH utilizando la librería de espectros. Un total de 11125 iones fragmento fueron detectados y sus trazas cromatográficas extraídas de las carreras SWATH, correspondiendo a 1590 péptidos y 263 proteínas. Los niveles de abundancia de las proteínas se calcularon a partir de los valores de los péptidos correspondientes a cada proteínas, que a su vez se calcularon sumando las áreas bajo pico de las trazas cromatográficas de los iones fragmento correspondientes a cada péptido. Estos niveles de abundancia de las proteínas se utilizaron para obtener la tasa de cambio (fold change) entre las dos condiciones, enfermos y sanos.

Los niveles de abundancia de todas las proteínas cuantificadas se analizaron mediante tres algoritmos de clasificación diferentes para seleccionar aquellos biomarcadores que mejor discriminan entre los individuos con déficit de GH y los controles sanos. El resultado del proceso de selección de biomarcadores mediante la combinación de los tres algoritmos de clasificación se visualizó mediante un gráfico de importancia (Figura 1). Los ocho mejores biomarcadores resultaron ser FIBA, FHR4, APOA4, FINC, CXCL7, F13A, SAA2 y APOC4.

Para analizar si dichos niveles de expresión son diferentes en los dos grupos, déficit de GH y controles sanos, se utilizó el test de Mann-Whitney. En la figura 2 se muestran los diagramas de caja (box-plot) para los ocho mejores biomarcadores, indicando el valor p derivado de la prueba estadística de Mann-Whitney. Para determinar si las proteínas mejor clasificadas podrían usarse como marcadores para la detección del déficit de GH, se evaluó su valor diagnóstico (la habilidad de diferenciar entre los dos grupo, défict de GH y controles sanos) de cada biomarcador. La sensibilidad y especificidad para cada biomarcador se analizaron usando el método área bajo la curva (area under curve, AUC) ROC.

La Tabla 1 recoge los ocho mejores biomarcadores seleccionados por dicha combinación de algoritmos, indicando la tasa de cambio (fold change, FC), el valor p según prueba estadística de Mann-Whitney para diferenciar los dos grupo, y el valor AUC del análisis ROC.

Tabla 1. Ocho biomarcadores que mejor diferencian entre individuos con défict de GH y controles sanos, seleccionadas por los tres algoritmos de clasificación utilizados. Sus niveles de expresión relativa se dan por su correspondiente tasa de cambio (fold change, FC), y su capacidad para diferenciar los dos grupos fue analizada estadísticamente mediante el test de

Mann-Whitney (p-valor por debajo de 0.001 indica que la diferencia entre los dos grupos es estadísticamente significativa) y por análisis ROC.

Biomarcador	Ranking según algoritmos de clasificación	Fold change (déficit GH/control)	p-valor	AUC (análisis ROC)
FIBA	1	0.05	$1.94 \cdot 10^{-5}$	0.960
FHR4	2	5.99	$2.80 \cdot 10^{-5}$	0.951
APOA4	3	0.31	$2.80 \cdot 10^{-5}$	0.951
FINC	4	3.75	$4.81 \cdot 10^{-5}$	0.938
CXCL7	5	3.30	$5.05 \cdot 10^{-6}$	0.991
F13A	6	0.51	$1.15 \cdot 10^{-4}$	0.916
SAA2	7	0.03	$1.36 \cdot 10^{-4}$	0.911
APOC4	8	0.24	$1.60 \cdot 10^{-4}$	0.907

Una herramienta útil para evaluar la capacidad diagnóstica de una prueba cuantitativa es la denominada curva ROC. Para obtener dicha curva, se calcula la proporción de verdaderos positivos, o sensibilidad, y la proporción de verdaderos negativos, o especificidad, para cada una de las proteínas (o combinaciones de proteínas) de interés, y se representan en una gráfica, con la sensibilidad en el eje Y y 1-Especificidad en el eje X. Por tanto, cuanto más desplazada esté la curva ROC hacia el vértice superior izquierdo, mejor es la capacidad discriminatoria del biomarcador o conjunto de biomarcadores. Precisamente una forma de evaluar de manera global dicha capacidad discriminatoria consiste en calcular el área del polígono que queda bajo la curva ROC, y se denomina área bajo curva (area under curve, AUC), que sirve como índice de comparación entre la la capacidad diagnóstica de diferentes biomarcadores: cuanto mayor es el AUC, mejor es la capacidad diagnóstica. Para determinar la sensibilidad y especificidad de cada biomarcador, se establecieron aquellos puntos de corte que proporcionan los mejores puntos de renuncia entre la mayor sensibilidad y la mayor especificidad.

El análisis ROC del biomarcador FIBA produjo un patrón para diferenciar individuos con déficit de GH de individuos sanos con un valor AUC de 0.960, con sensibilidad del 93.3% y especificidad del 100% (Figura 3).

El análisis ROC del biomarcador FHR4 produjo un patrón para diferenciar individuos con déficit de GH de individuos sanos con un valor AUC de 0.951, con sensibilidad del 100% y especificidad del 80% (Figura 4).

El análisis ROC del biomarcador APOA4 produjo un patrón para diferenciar individuos con déficit de GH de individuos sanos con un valor AUC de 0.951, con sensibilidad del 100% y

especificidad del 93.3% (Figura 5).

El análisis ROC del biomarcador FINC produjo un patrón para diferenciar individuos con déficit de GH de individuos sanos con un valor AUC de 0.938, con sensibilidad del 93.3% y especificidad del 100% (Figura 6).

El análisis ROC del biomarcador CXCL7 produjo un patrón para diferenciar individuos con déficit de GH de individuos sanos con un valor AUC de 0.991, con sensibilidad del 100% y especificidad del 93.3% (Figura 7).

El análisis ROC del biomarcador F13A produjo un patrón para diferenciar individuos con déficit de GH de individuos sanos con un valor AUC de 0.916, con sensibilidad del 80% y especificidad del 93.3%. (Figura 8).

El análisis ROC del biomarcador SAA2 produjo un patrón para diferenciar individuos con déficit de GH de individuos sanos con un valor AUC de 0.911, con sensibilidad del 93.3% y especificidad del 80%. (Figura 9).

El análisis ROC del biomarcador APOC4 produjo un patrón para diferenciar individuos con déficit de GH de individuos sanos con un valor AUC de 0.907, con sensibilidad del 73.3% y especificidad del 100% (Figura 10).

Seguidamente, para determinar si diferentes combinaciones de biomarcadores en su conjunto, y qué proteínas combinadas proporcionan la mejor distinción posible entre individuos con déficit de GH y controles sanos, se analizaron distintas combinaciones de marcadores para obtener curvas ROC integradas.

El análisis ROC de la combinación de biomarcadores FIBA y FHR4 produjo un patrón para diferenciar individuos con déficit de GH de individuos sanos con un valor AUC de 0.987, con sensibilidad del 93.3% y especificidad del 100% (Figura 11).

El análisis ROC de la combinación de biomarcadores FIBA y APOA4 produjo un patrón para diferenciar individuos con déficit de GH de individuos sanos con un valor AUC de 0.991, con sensibilidad del 93.3% y especificidad del 100% (Figura 12).

El análisis ROC de la combinación de biomarcadores FIBA y FINC produjo un patrón para diferenciar individuos con déficit de GH de individuos sanos con un valor AUC de 0.956, con sensibilidad del 93.3% y especificidad del 100% (Figura 13).

El análisis ROC de la combinación de biomarcadores FIBA y CXCL7 produjo un patrón para diferenciar individuos con déficit de GH de individuos sanos con un valor AUC de 0.996, con sensibilidad del 100% y especificidad del 93.3% (Figura 14).

El análisis ROC de la combinación de biomarcadores FHR4 y APOA4 produjo un patrón para diferenciar individuos con déficit de GH de individuos sanos con un valor AUC de 0.947, con

sensibilidad del 100% y especificidad del 93.3% (Figura 15).

El análisis ROC de la combinación de biomarcadores FHR4 y FINC produjo un patrón para diferenciar individuos con déficit de GH de individuos sanos con un valor AUC de 0.973, con sensibilidad del 93.3% y especificidad del 100% (Figura 16).

El análisis ROC de la combinación de biomarcadores FHR4 y CXCL7 produjo un patrón para diferenciar individuos con déficit de GH de individuos sanos con un valor AUC de 0.991, con sensibilidad del 100% y especificidad del 93.3% (Figura 17).

El análisis ROC de la combinación de biomarcadores APOA4 y FINC produjo un patrón para diferenciar individuos con déficit de GH de individuos sanos con un valor AUC de 0.0.978, con sensibilidad del 93.3% y especificidad del 100% (Figura 18).

El análisis ROC de la combinación de biomarcadores APOA4 y CXCL7 produjo un patrón para diferenciar individuos con déficit de GH de individuos sanos con un valor AUC de 0.996, con sensibilidad del 100% y especificidad del 93.3%, o viceversa (Figura 19).

El análisis ROC de la combinación de biomarcadores FINC y CXCL7 produjo un patrón para diferenciar individuos con déficit de GH de individuos sanos con un valor AUC de 0.996, con sensibilidad del 100% y especificidad del 93.3%, o viceversa (Figura 20).

El análisis ROC de la combinación de los tres primeros biomarcadores, FIBA, FHR4 y APOA4, produjo un patrón para diferenciar individuos con déficit de GH de individuos sanos con un valor AUC de 0.991, con sensibilidad del 93.3% y especificidad del 100% (Figura 21).

El análisis ROC de la combinación de los cuatro primeros biomarcadores FIBA, FHR4, APOA4 y FINC, produjo un patrón para diferenciar individuos con déficit de GH de individuos sanos con un valor AUC de 0.991, con sensibilidad del 93.3% y especificidad del 100% (Figura 22).

El análisis ROC de la combinación de los cinco primeros biomarcadores FIBA, FHR4, APOA4, FINC y CXCL7, produjo un patrón para diferenciar individuos con déficit de GH de individuos sanos con un valor AUC de 1.0, con sensibilidad del 100% y especificidad del 100% (Figura 23).

Por tanto, el grupo de los primeros cinco biomarcadores, FIBA, FHR4, APOA4, FINC y CXCL7, mostró el mejor rendimiento para detectar déficit de GH en muestras séricas, reflejando una sensibilidad del 100% y una especificidad del 100%.

REIVINDICACIONES

1.- Un método de detección, diagnóstico y pronóstico del déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, que comprende

a) Cuantificar los niveles de expresión de *FIBA, FHR4, APOA4, FINC, CXCL7, F13A, SAA2* y/o *APOC4,* o cualquiera de sus combinaciones, en una muestra biológica aislada de un individuo.

b) Comparar los niveles obtenidos en el paso (a) con un valor de referencia, o con los niveles de expresión de *FIBA, FHR4, APOA4, FINC, CXCL7, F13A, SAA2* y/o *APOC4* obtenidos en una muestra de referencia.

c) asignar los pacientes que presentan unos niveles de expresión de *FIBA, FHR4, APOA4, FINC, CXCL7, F13A, SAA2* y/o *APOC4* obtenidos en el paso (b) diferentes y estadísticamente significativos al valor de referencia o a los niveles de la muestra de referencia, al grupo de individuos con riesgo de padecer déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, o al grupo de individuos que padecen déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH.

2.- El método según la reivindicación anterior, comprende asignar los pacientes que presentan unos niveles de expresión de *FHR4, FINC y CXCL7* obtenidos en el paso (b) superiores y estadísticamente significativos al valor de referencia o a los niveles de la muestra de referencia, al grupo de individuos con riesgo de padecer déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, o al grupo de individuos que padecen déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH.

3.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, comprende asignar los pacientes que presentan unos niveles de expresión de *FIBA, APOA4, F13A, SAA2* y *APOC4* obtenidos en el paso (b) inferiores y estadísticamente significativos al valor de referencia o a los niveles de la muestra de referencia, al grupo de individuos con riesgo de padecer déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, o al grupo de individuos que padecen déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH.

4.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 2-3 donde los niveles de expresión medios de *FHR4*, *FINC* y *CXCL7* están al menos 5,5 (para *FHR4*), 3,5 (para *FINC*) y 3,0 (para *CXCL7*) veces más aumentados en la muestra del grupo de individuos con riesgo de padecer déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, o en el grupo de individuos que padecen déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, que en la muestra de referencia.

5.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 2-4, donde los niveles de expresión medios de *FHR4*, *FINC* y *CXCL7* están al menos 5,99 (para *FHR4*), 3,75 (para *FINC*) y 3,30 (para *CXCL7*) veces más aumentados en la muestra del grupo de individuos con riesgo de padecer déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, o en el grupo de individuos que padecen déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, que en la muestra de referencia.

6.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 2-5, donde los niveles de expresión medios de *FIBA*, *APOA4, F13A*, *SAA2*, y *APOC4* son al menos 18 (para FIBA), 3 (para APOA4), 1,5 (para F13A), 33 (para SAA2), y 4 (para APOC4) veces menores en las muestras del grupo de individuos con riesgo de padecer déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, o del grupo de individuos que padecen déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, que en la muestra de referencia.

9.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 2-7, donde los niveles de expresión medios de *FIBA*, *APOA4, F13A*, *SAA2*, y *APOC4* son al menos 20 (para *FIBA*), 3,23 (para *APOA4*), 1,96 (para *F13A*), 33,33 (para *SAA2*), y 4,17 (para *APOC4*) veces menores en las muestras del grupo de individuos con riesgo de padecer déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, o del grupo de individuos que padecen déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, que en la muestra de referencia.

10.- Un método de seguimiento de la evolución del déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH, de ahora en adelante tercer método de la invención, que comprende los pasos (a) y (c) del método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, y además comprende:

d) repetir al menos dos veces la secuencia de pasos (a) – (c) en muestras obtenidas del mismo individuo según el paso (a), de manera no simultánea.

11.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde los pasos (a), (b) (c) y/o (d) pueden ser total o parcialmente automatizados y/o computerizados.

12.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde los individuos tienen menos de 12 años.

13- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde los individuos tienen 11 años o menos.

14.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde los individuos tienen entre 7 y 11 años.

15.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde la muestra biológica es suero.

16.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde los niveles de expresión se determinan mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

17.- Un kit o dispositivo que comprende los elementos y/o reactivos necesarios para cuantificar los niveles del producto de expresión de los genes *FIBA, FHR4, APOA4, FINC, CXCL7, F13A, SAA2* y/o *APOC4,* o cualquiera de sus combinaciones.

18.- El kit o dispositivo según la reivindicación anterior que comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de cuantificar el producto de expresión de los biomarcadores de la invención, y donde:

- los cebadores o primers son secuencias de polinucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases, más preferiblemente de entre 15 y 25 pares de bases, aún más preferiblemente de entre 18 y 22 pares de bases, y aún mucho más preferiblemente de alrededor de 20 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la 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 y/o la SEQ ID NO: 20.
- las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 30 y 1100 pares de bases, más preferiblemente de entre 100 y 1000 pares de bases, y aún más preferiblemente de entre 150 y 500 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la 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 y/o la SEQ ID NO: 20.
- los anticuerpos son capaces de unirse específicamente a una región formada por cualquiera de las secuencias aminoacídicas 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, y/o SEQ ID NO: 12.

19.- El kit según la reivindicación 11 que comprende un espectrómetro de masas, un cromatógrafo, espectrómetro de RNM, o cualquiera de sus combinaciones.

20.- El uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 17-19 para la detección, diagnóstico y pronóstico del déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH.

FIGURAS

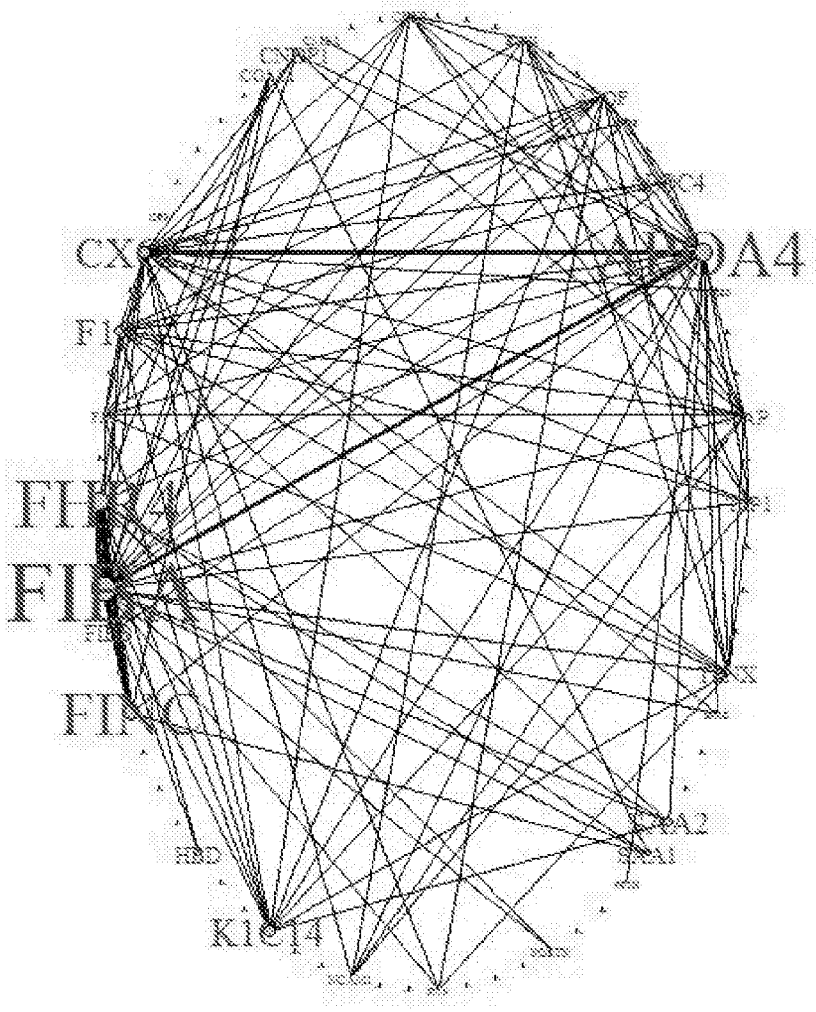


Figura 1

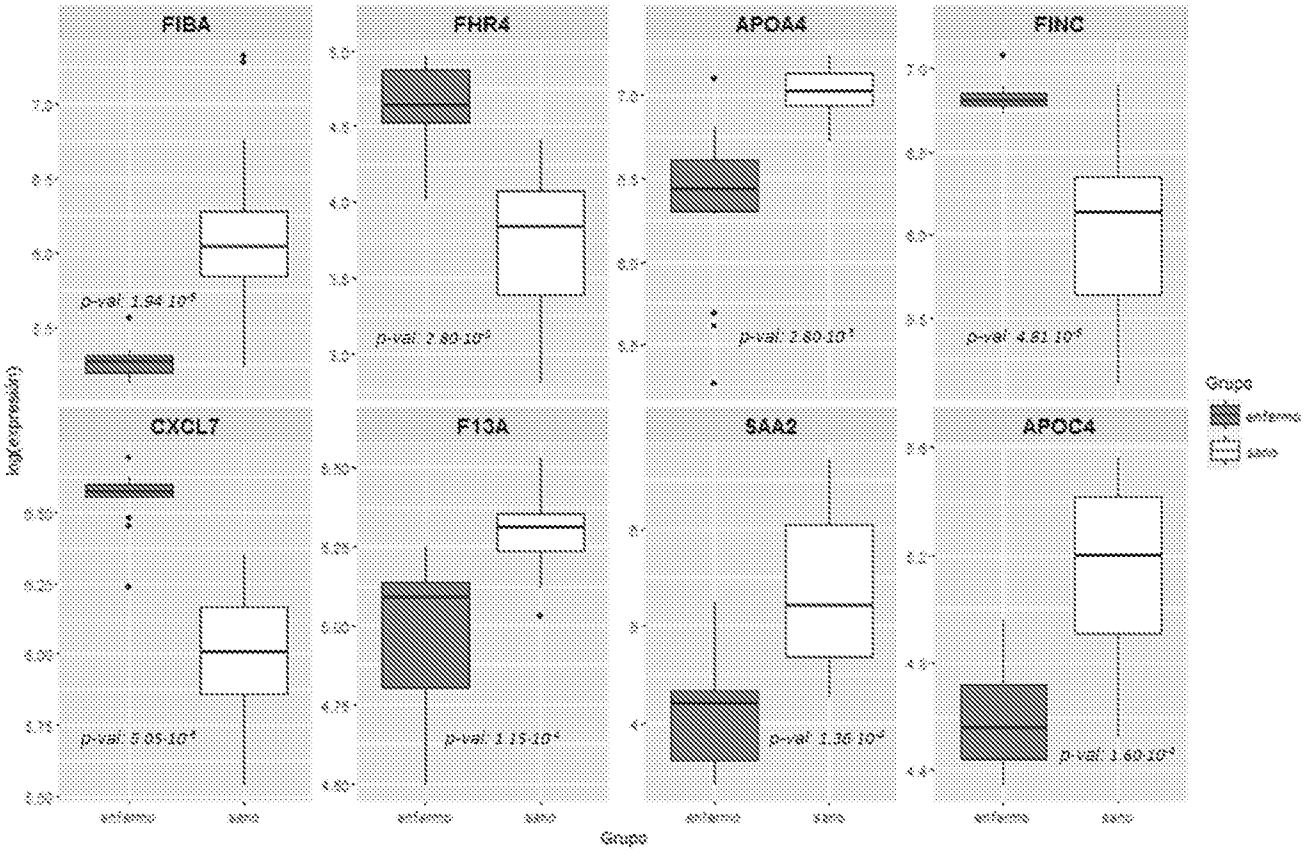

FIBA
FHR4
APOA4
FINC
CXCL7
F13A
SAA2
APOC4
p-val: 1.64·10⁻⁵
p-val: 2.80·10⁻⁵
p-val: 2.80·10⁻⁵
p-val: 4.61·10⁻⁵
p-val: 5.05·10⁻⁵
p-val: 1.15·10⁻⁴
p-val: 1.36·10⁻⁴
p-val: 1.60·10⁻⁴
log2 expression
enfermo
sano
Grupo

Figura 2

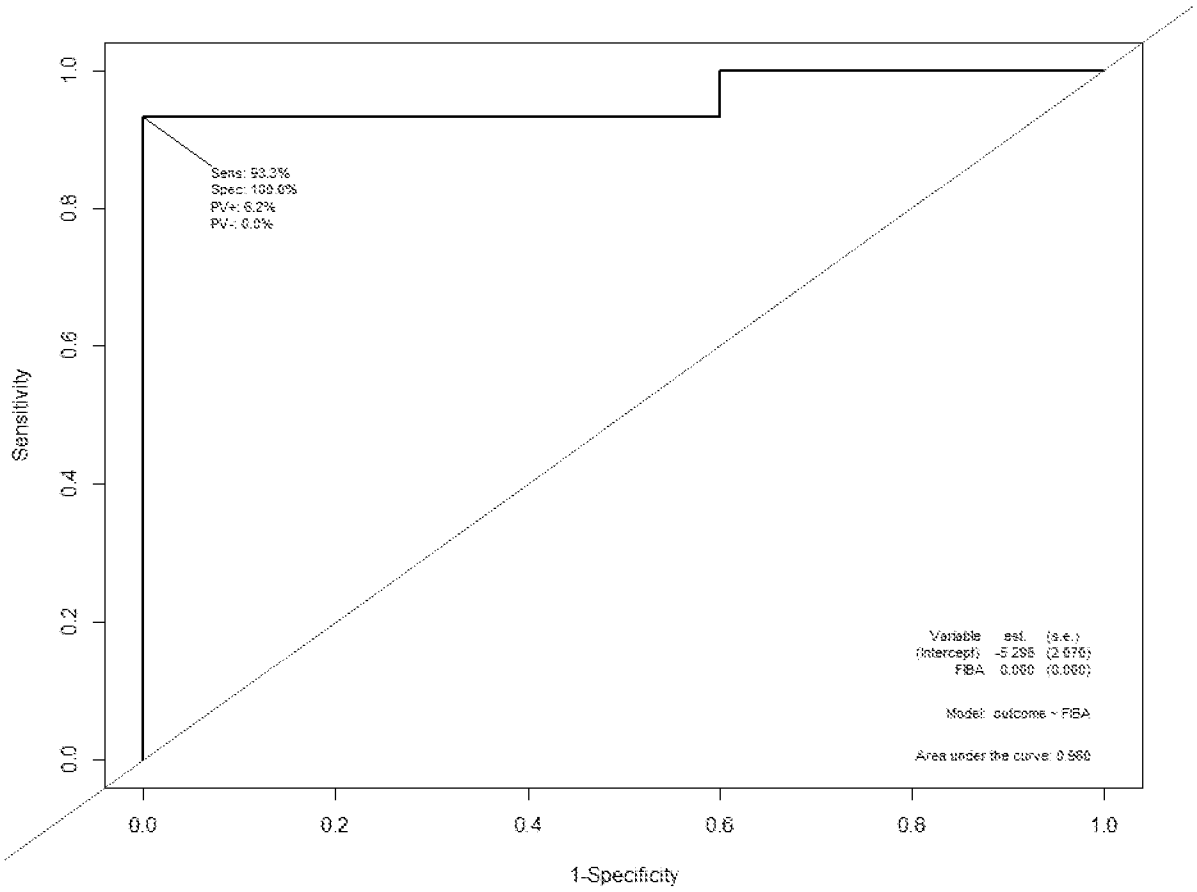

Sens: 93.3%
Spec: 100.0%
PV+: 6.2%
PV-: 0.0%
Variable est. (s.e.)
(Intercept) -5.295 (2.570)
FIBA 0.050 (0.030)
Model: outcome ~ FIBA
Area under the curve: 0.960
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

Figura 3

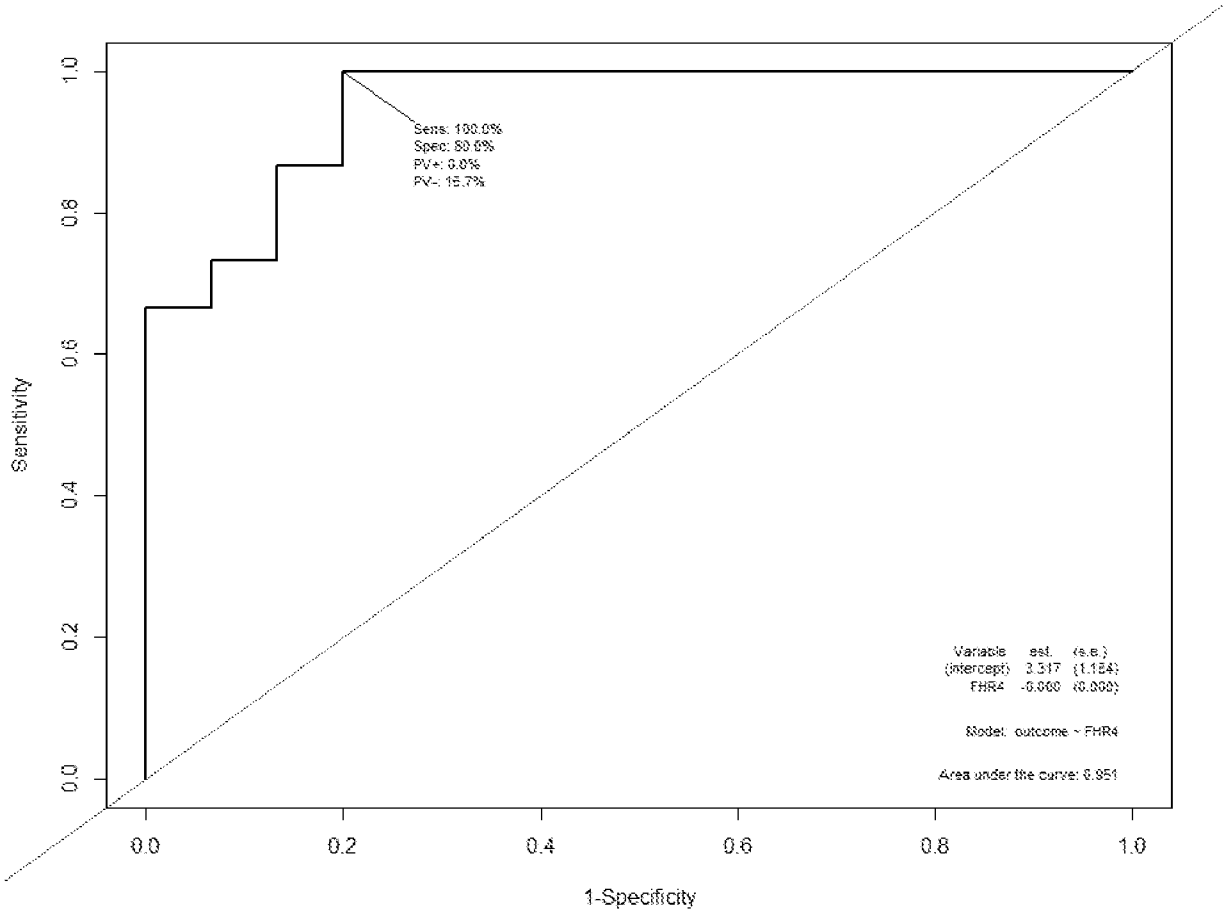

Sens: 100.0%
Spec: 80.6%
PV+: 6.8%
PV-: 15.7%
Variable est. (s.e.)
(intercept) 3.317 (1.154)
FHR4 -0.033 (0.009)
Model: outcome ~ FHR4
Area under the curve: 0.951
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

Figura 4

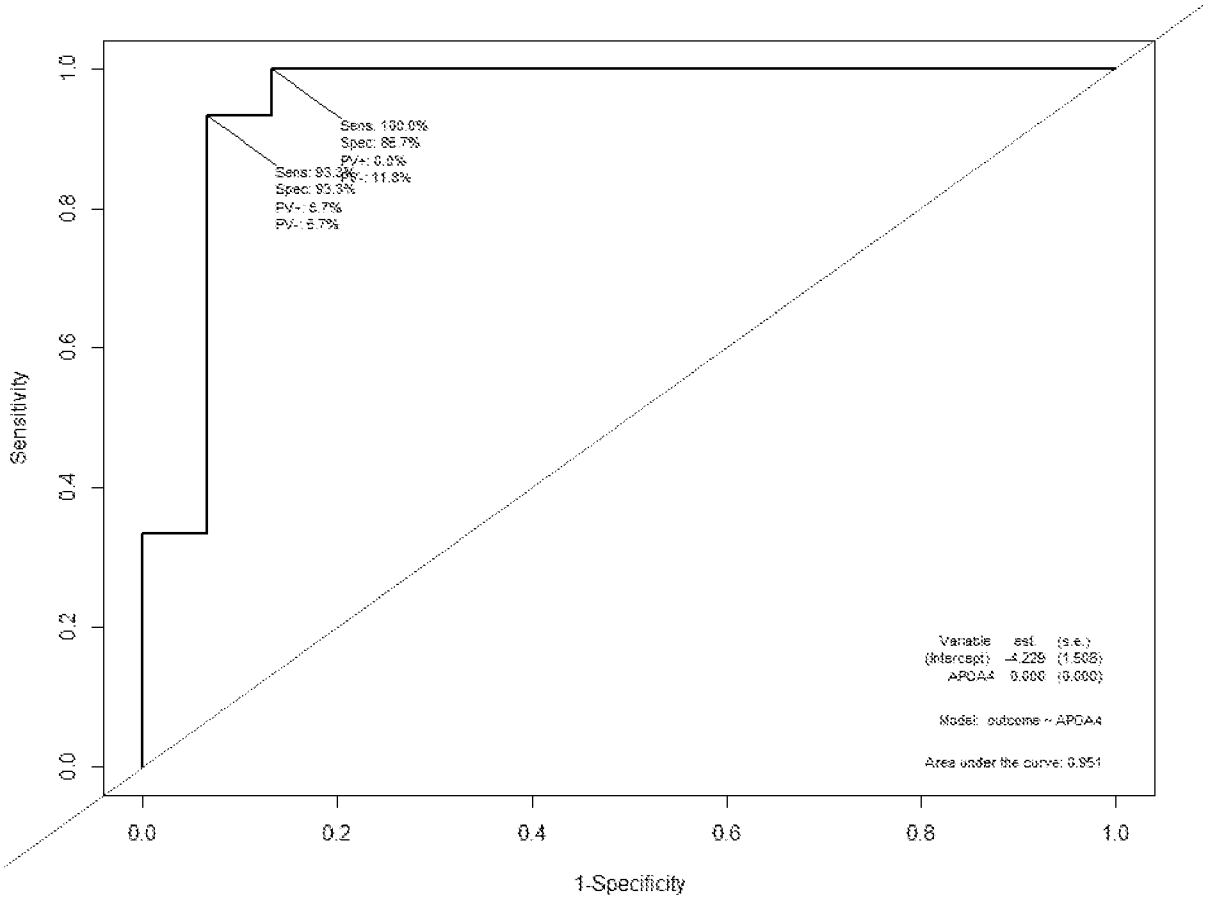

Sens: 100.0%
Spec: 86.7%
PV+: 6.8%
PV-: 11.8%
Sens: 93.3%
Spec: 93.3%
PV+: 8.7%
PV-: 5.7%
Variable est (s.e.)
(Intercept) -4.229 (1.508)
APOA4 0.000 (0.000)
Model: outcome ~ APOA4
Area under the curve: 0.951
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

Figura 5

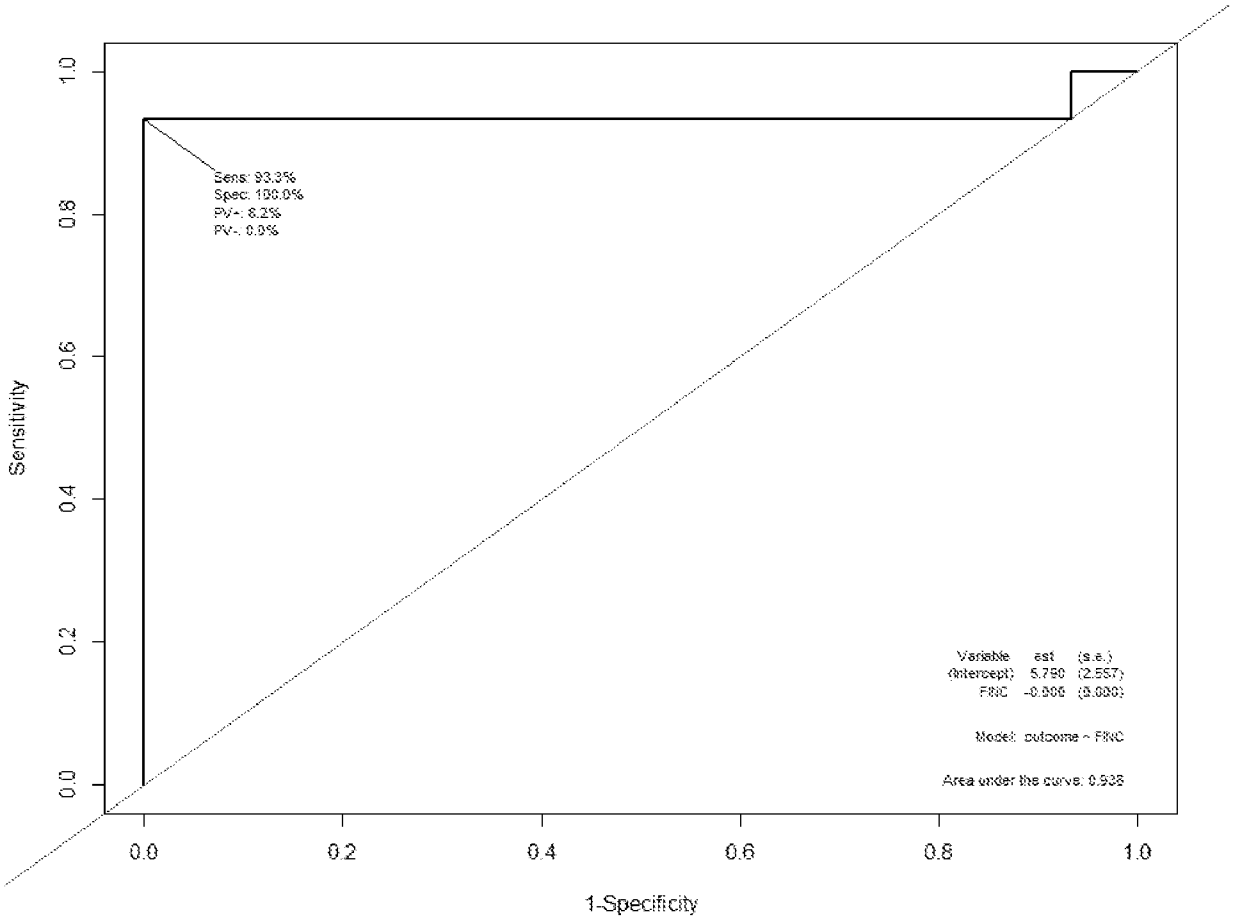

Sens: 93.3%
Spec: 100.0%
PV+: 8.2%
PV-: 0.0%
Variable est (s.e.)
(Intercept) 5.750 (2.557)
FRIC -0.066 (0.030)
Model: outcome ~ FRIC
Area under the curve: 0.938
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

Figura 6

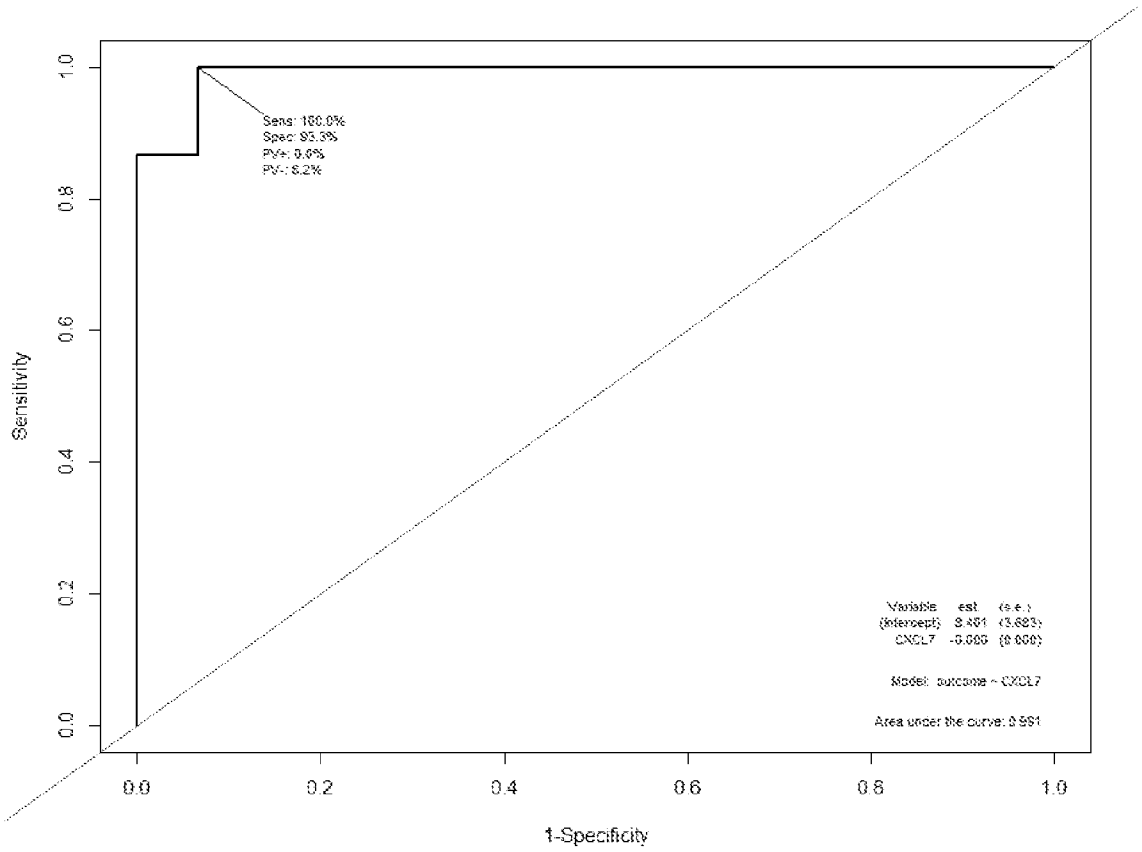

Sens: 100.0%
Spec: 93.3%
PV+: 8.6%
PV-: 8.2%
Variable est (s.e.)
(Intercept) 8.481 (3.683)
CXCL7 -0.085 (0.036)
Model: outcome ~ CXCL7
Area under the curve: 0.991
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

Figura 7

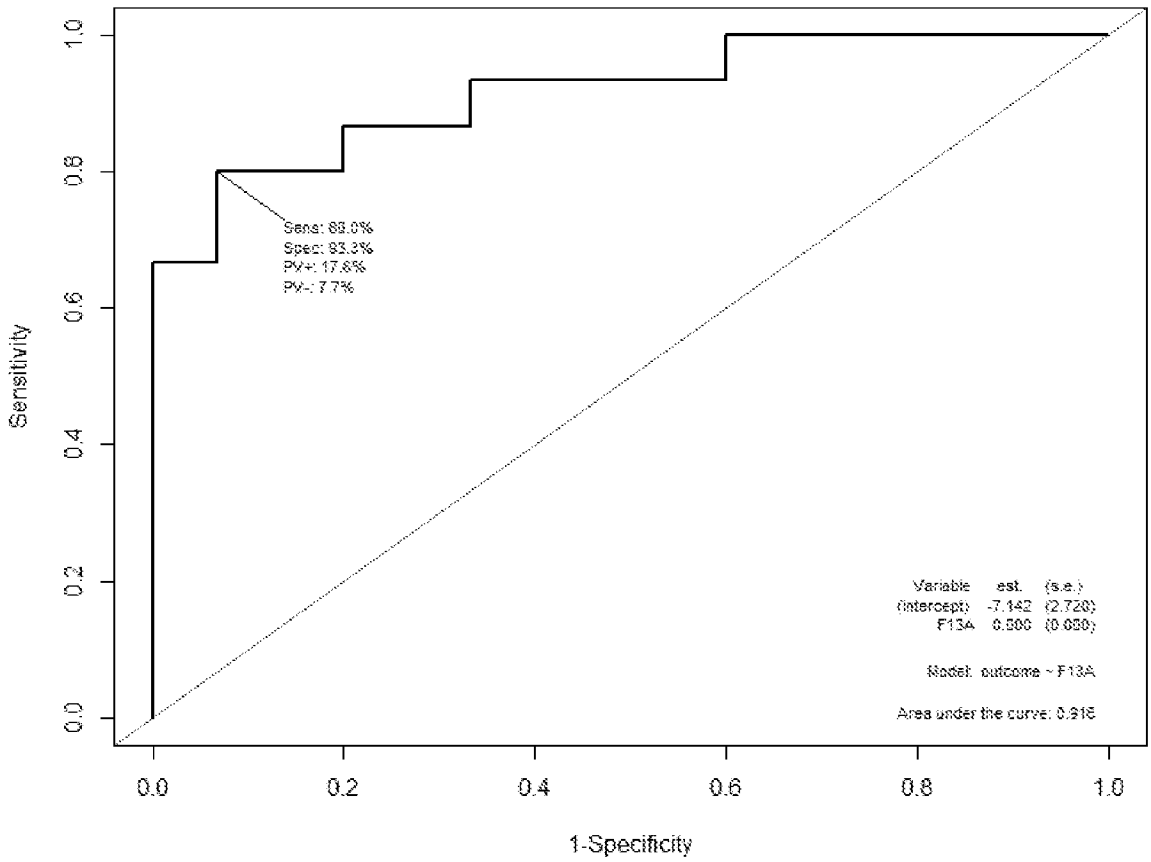

Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
Sens: 80.0%
Spec: 83.3%
PV+: 17.8%
PV-: 7.7%
Variable est. (s.e.)
(intercept) -7.142 (2.728)
F13A 0.500 (0.650)
Model: outcome ~ F13A
Area under the curve: 0.916

Figura 8

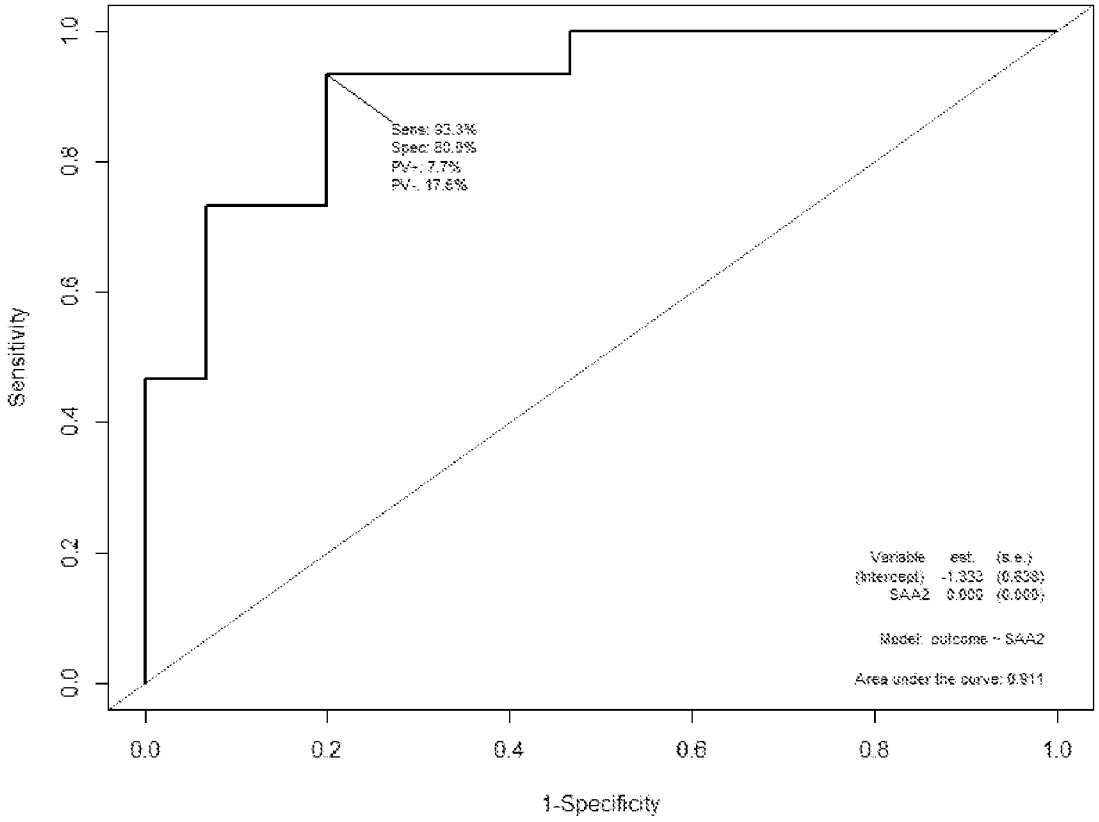

Sens: 93.3%
Spec: 80.8%
PV+: 7.7%
PV-: 17.6%
Variable est. (s.e.)
(Intercept) -1.332 (0.838)
SAA2 0.603 (0.000)
Model: outcome ~ SAA2
Area under the curve: 0.911
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

Figura 9

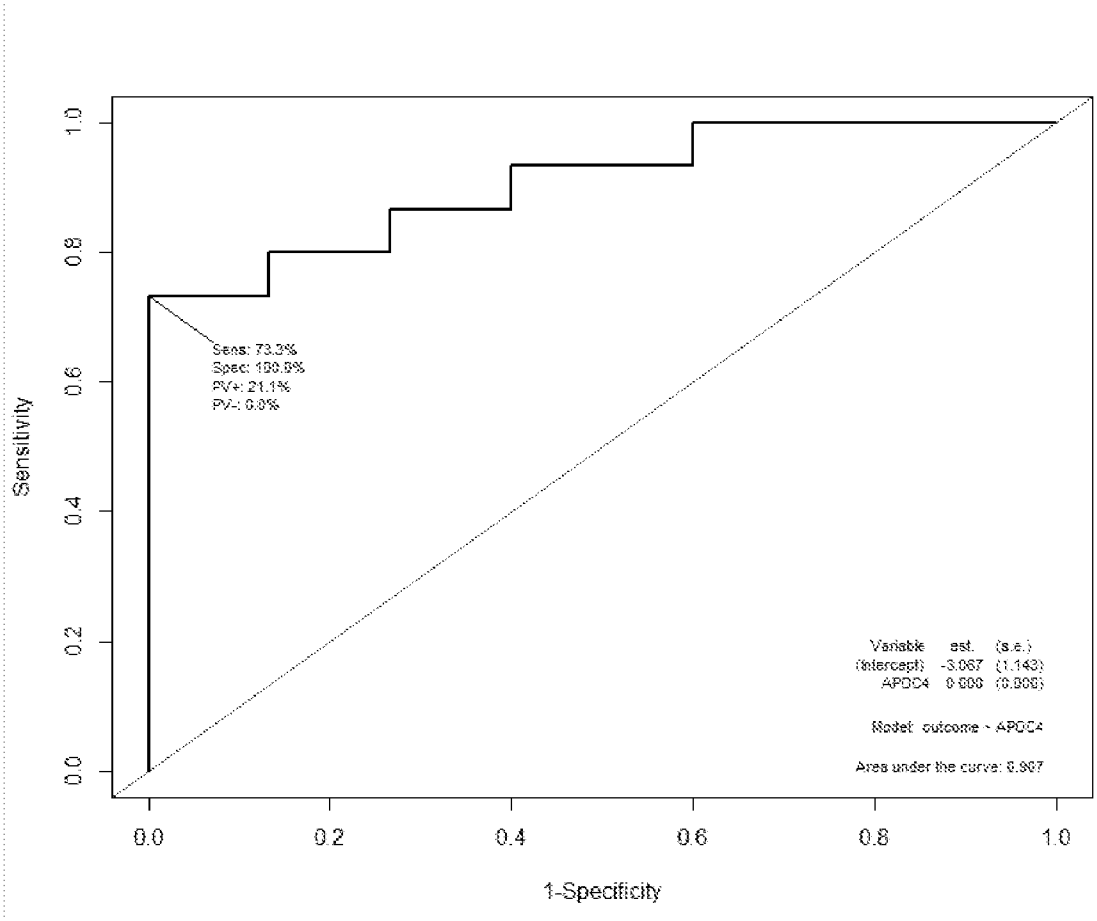

Sens: 73.3%
Spec: 100.0%
PV+: 21.1%
PV-: 0.0%
Variable est. (s.e.)
(Intercept) -3.067 (1.143)
APOC4 0.000 (0.000)
Model: outcome ~ APOC4
Area under the curve: 0.907
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

Figura 10

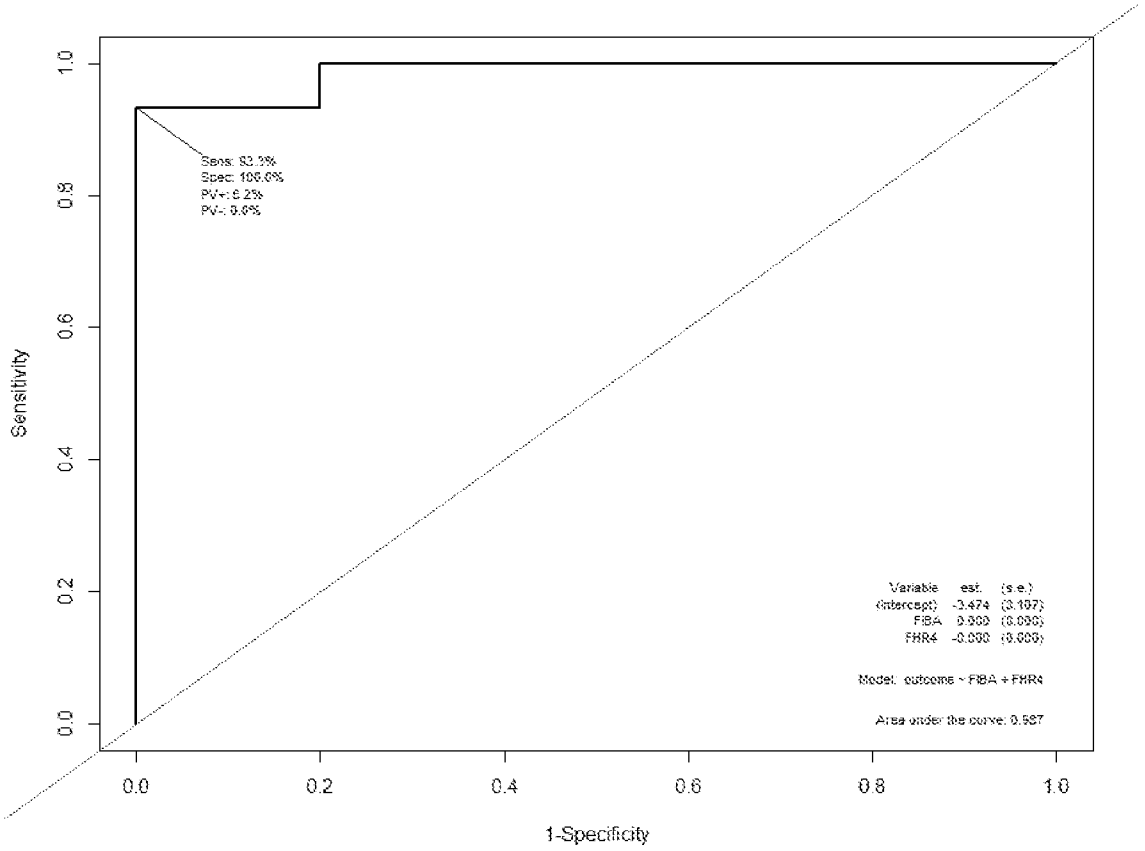

Sens: 93.3%
Spec: 100.0%
PV+: 6.2%
PV-: 0.6%
Variable est. (s.e.)
(Intercept) -3.474 (0.167)
FIBA 0.000 (0.000)
FHR4 -0.000 (0.000)
Model: outcome ~ FIBA + FHR4
Area under the curve: 0.567
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

Figura 11

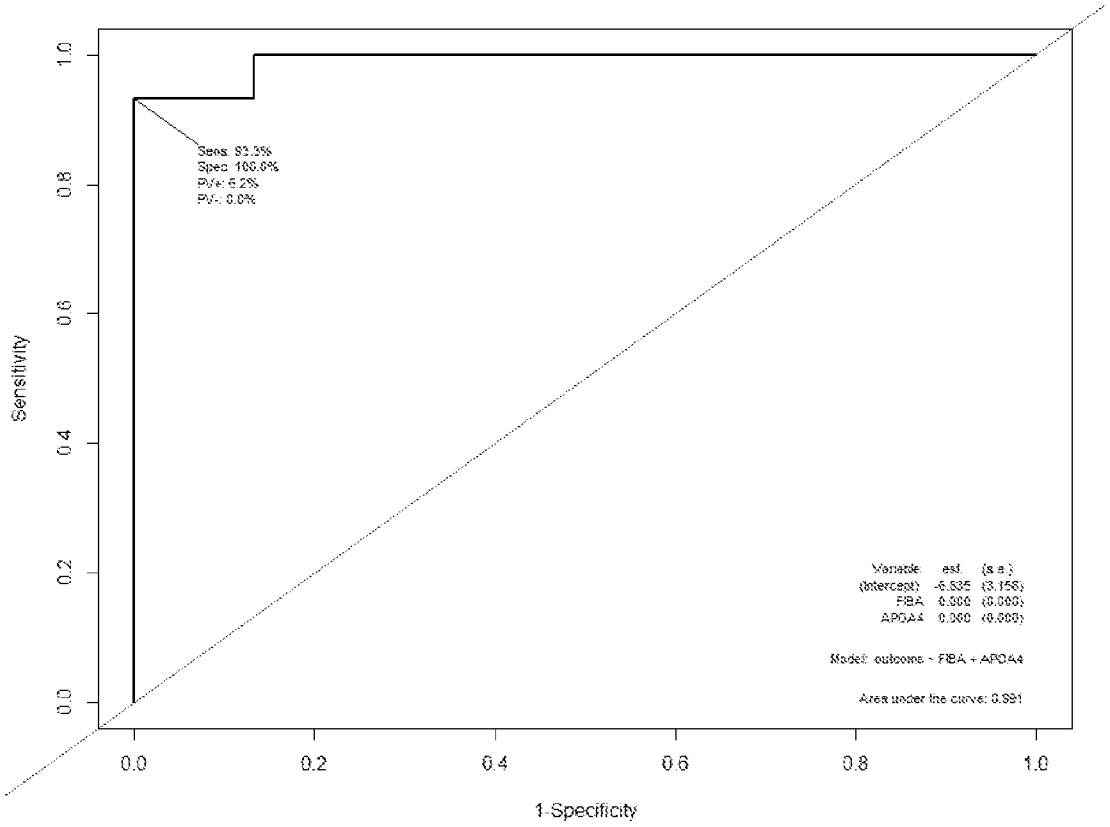

Sens: 93.3%
Spec: 100.0%
PV+: 6.2%
PV-: 0.0%
Variable: est. (s.e.)
(Intercept): -6.535 (3.158)
FIBA: 0.000 (0.000)
APOA4: 0.000 (0.000)
Model: outcome ~ FIBA + APOA4
Area under the curve: 0.991
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

Figura 12

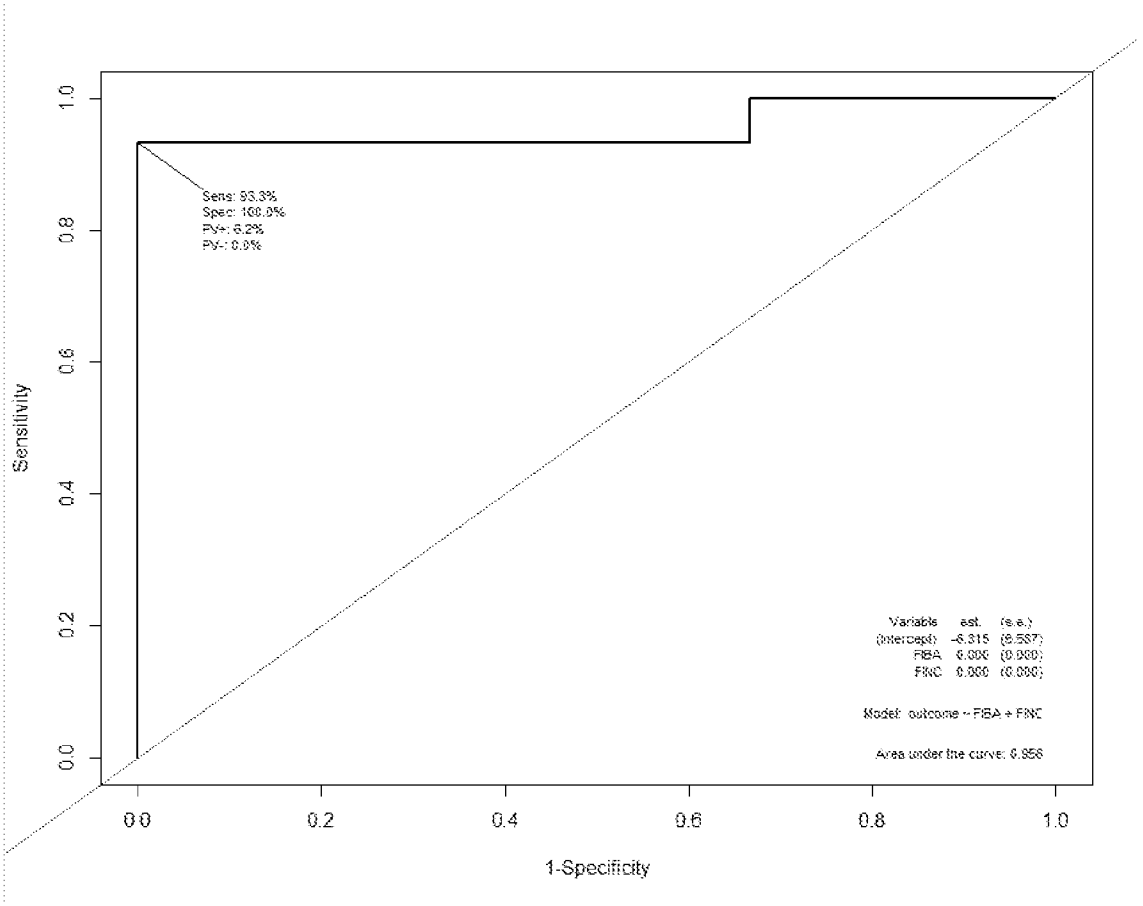

Sens: 93.3%
Spec: 100.0%
PV+: 6.2%
PV-: 0.0%
Variable est. (s.e.)
(Intercept) -6.315 (6.557)
FIBA 0.000 (0.000)
FINC 0.000 (0.000)
Model: outcome ~ FIBA + FINC
Area under the curve: 0.956
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

Figura 13

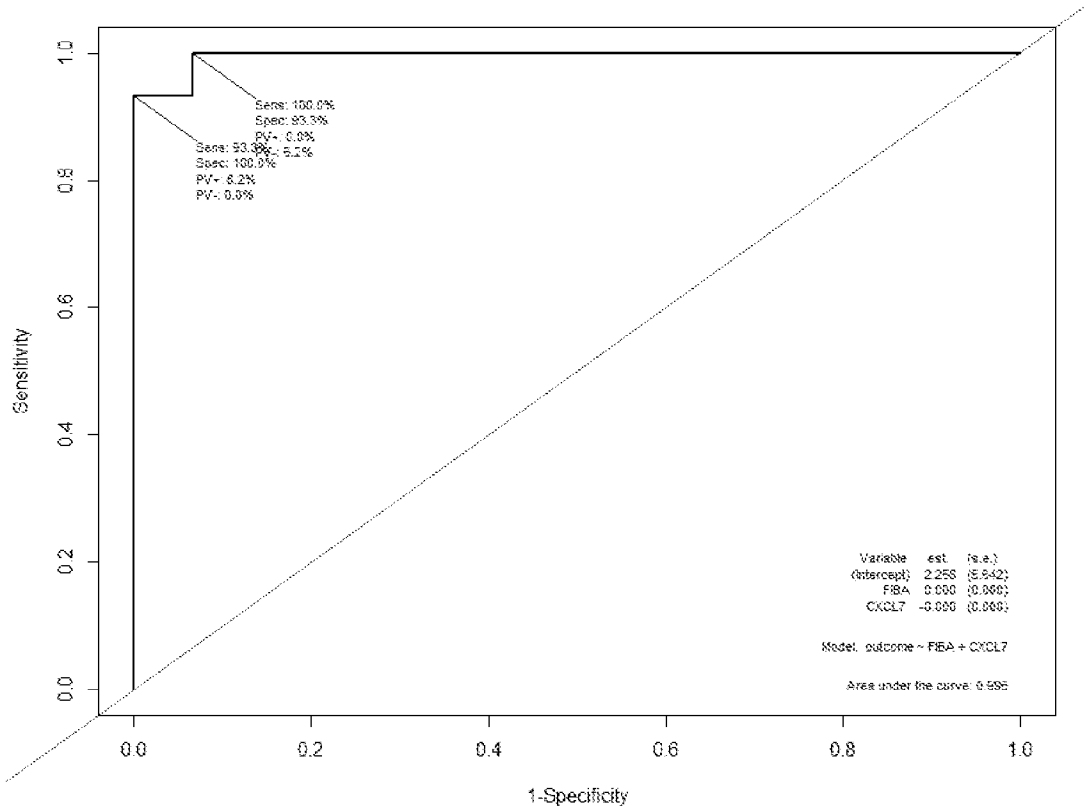

Sens: 100.0%
Spec: 93.3%
PV+: 6.8%
PV-: 6.1%
Sens: 93.3%
Spec: 100.0%
PV+: 8.2%
PV-: 6.8%
Variable est. (s.e.)
(Intercept) 2.255 (5.642)
FIBA 0.000 (0.000)
CXCL7 -0.000 (0.000)
Model: outcome ~ FIBA + CXCL7
Area under the curve: 0.995
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

Figura 14

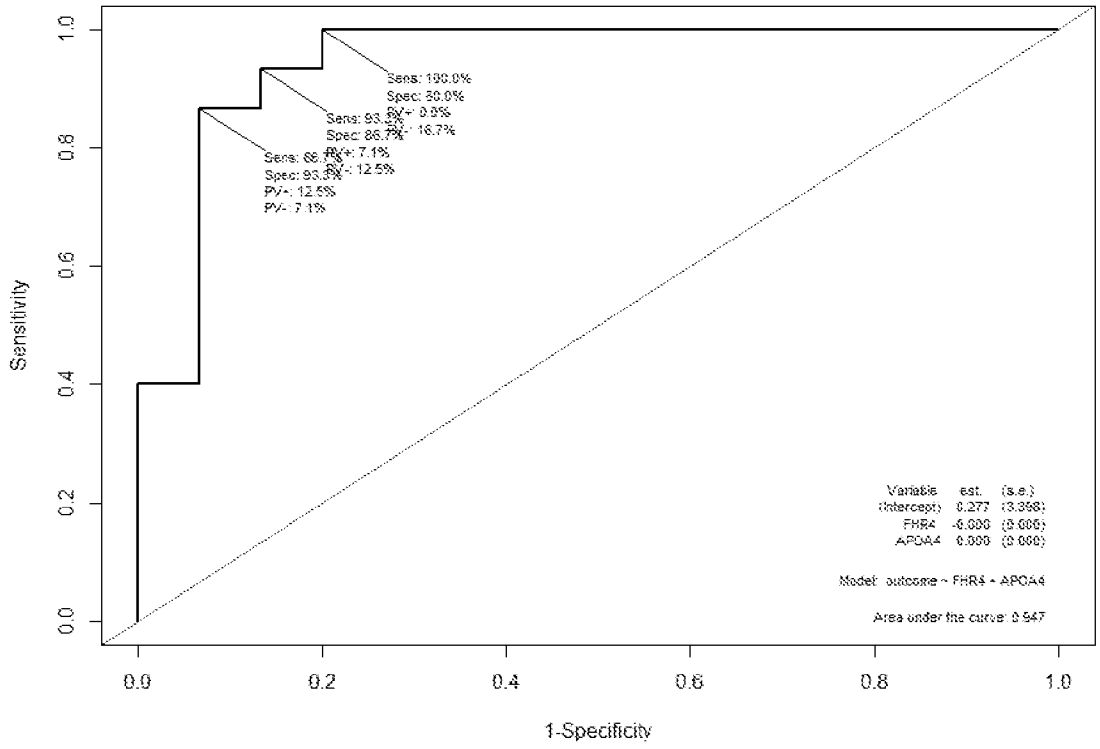

Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
Sens: 100.0%
Spec: 80.0%
PV+: 0.0%
PV-: 16.7%
Sens: 93.3%
Spec: 86.7%
PV+: 7.1%
PV-: 12.5%
Sens: 86.7%
Spec: 93.3%
PV+: 12.5%
PV-: 7.1%
Variable est. (s.e.)
(Intercept) 0.277 (3.358)
FHR4 -6.000 (3.000)
APOA4 0.000 (3.000)
Model: outcome ~ FHR4 + APOA4
Area under the curve: 0.947

Figura 15

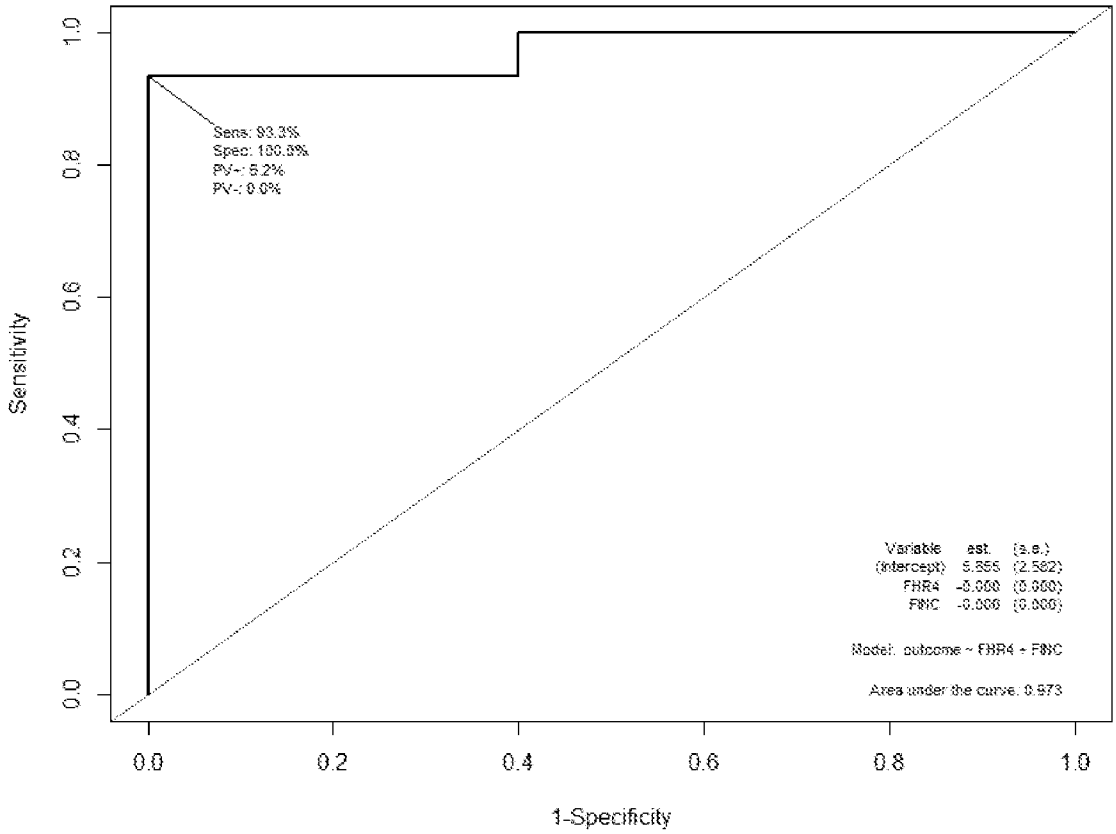

Sens: 93.3%
Spec: 100.0%
PV+: 5.2%
PV-: 0.0%
Variable est. (s.e.)
(Intercept) 5.855 (2.562)
FHR4 -0.000 (0.000)
FNC -0.006 (0.006)
Model: outcome ~ FHR4 + FNC
Area under the curve: 0.973
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

Figura 16

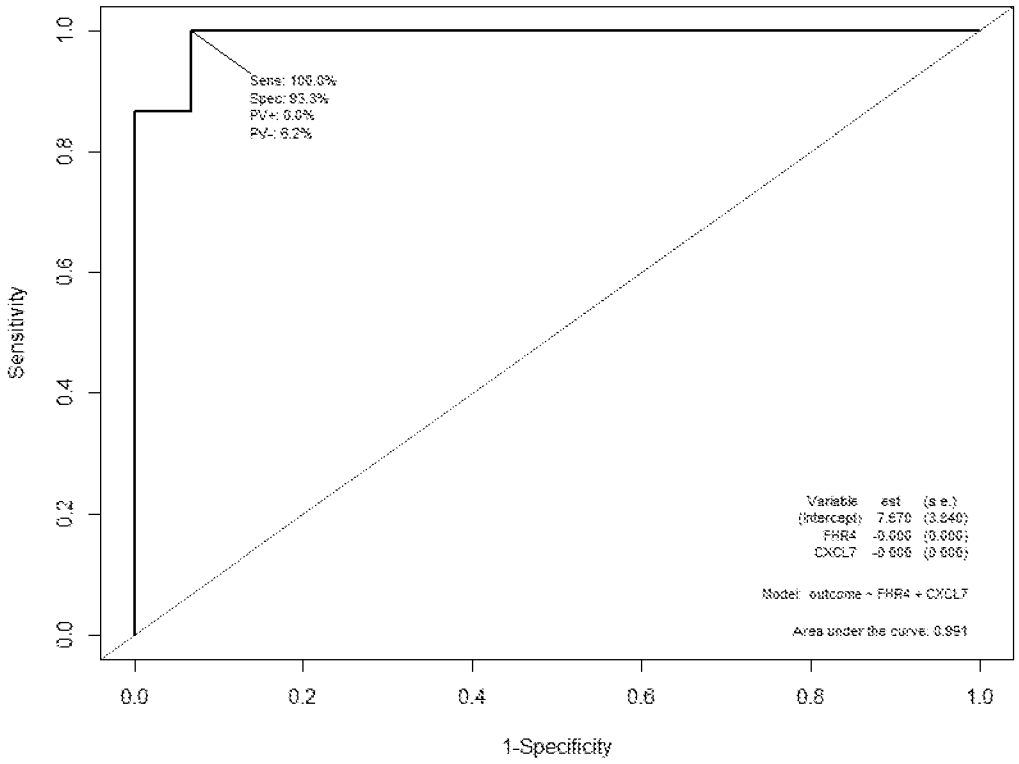

Sens: 100.0%
Spec: 93.3%
PV+: 0.0%
PV-: 8.2%
Variable est (s.e.)
(Intercept) 7.670 (3.840)
FHR4 -0.000 (0.000)
CXCL7 -0.000 (0.000)
Model: outcome ~ FHR4 + CXCL7
Area under the curve: 0.991
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

Figura 17

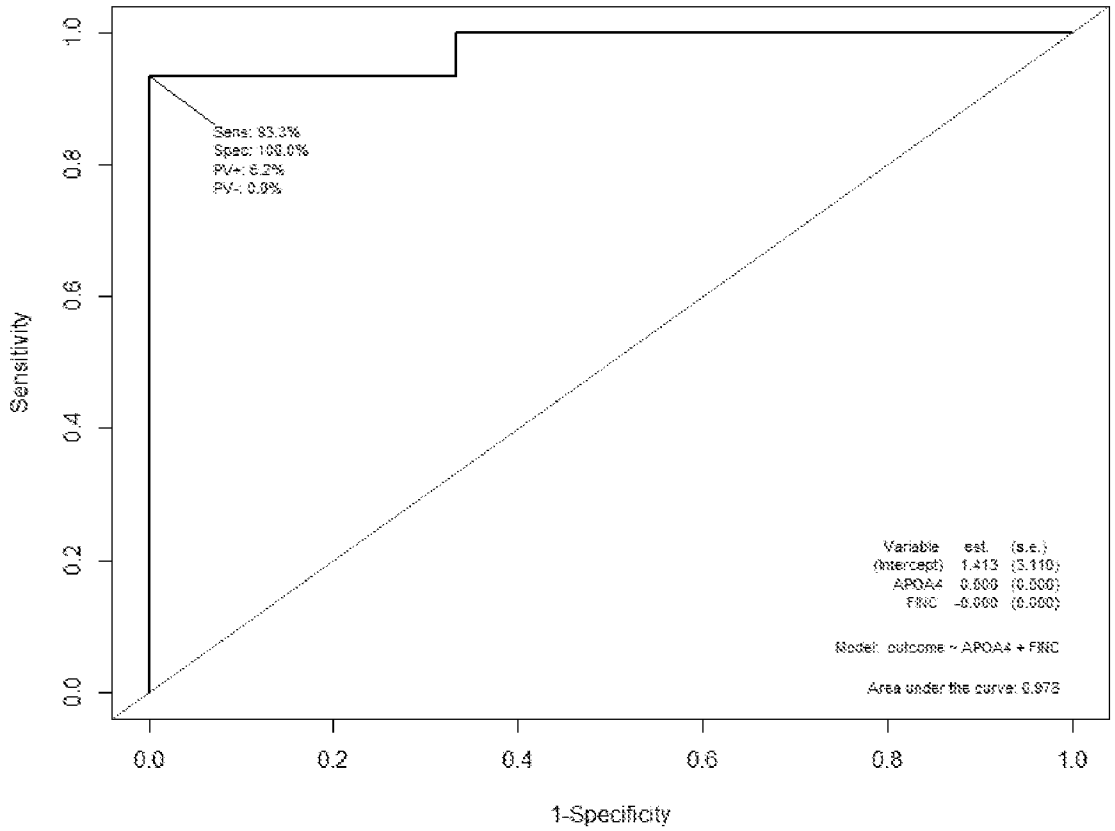

Sens: 93.3%
Spec: 100.0%
PV+: 8.2%
PV-: 0.8%
Variable est. (s.e.)
(Intercept) 1.413 (3.110)
APOA4 0.000 (0.000)
FINC -0.000 (0.000)
Model: outcome ~ APOA4 + FINC
Area under the curve: 0.973
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

Figura 18

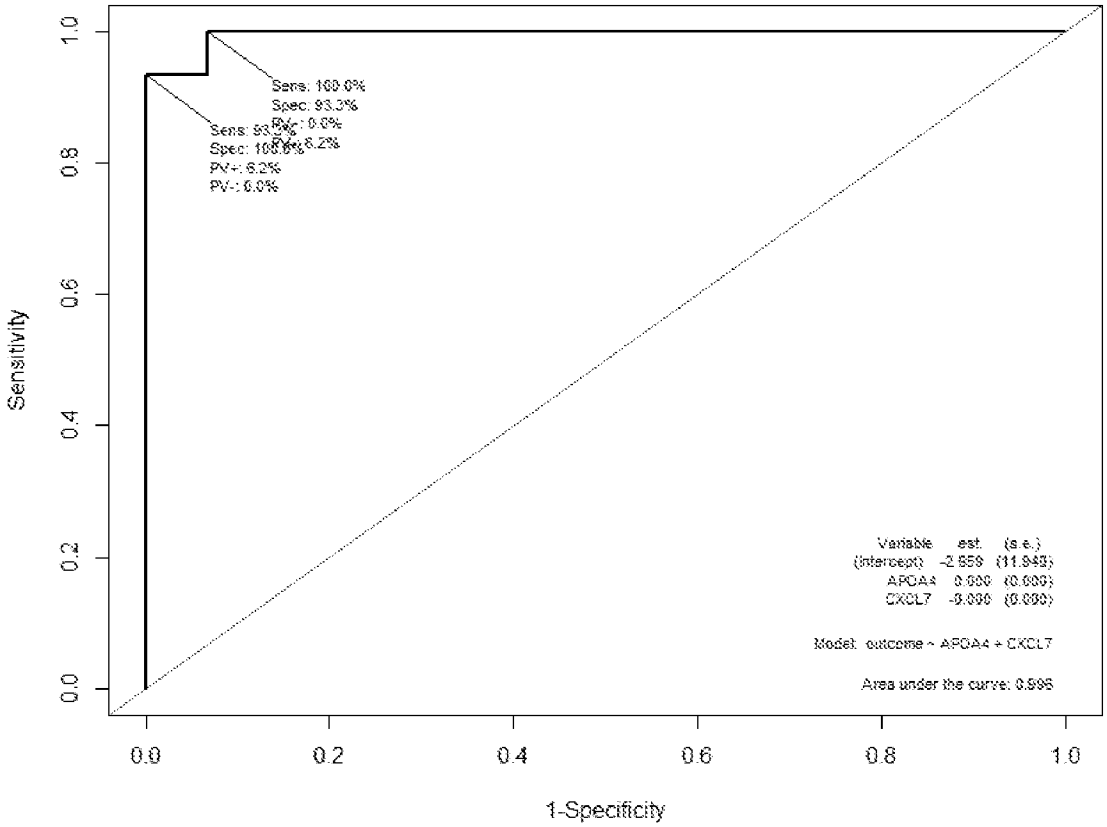

Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
Sens: 100.0%
Spec: 93.3%
PV+: 6.2%
PV-: 0.0%
Sens: 93.3%
Spec: 100.0%
PV+: 6.2%
PV-: 0.0%
Variable est. (s.e.)
(Intercept) -2.559 (11.943)
APOA4 0.000 (0.000)
CXCL7 -5.000 (0.000)
Model: outcome ~ APOA4 + CXCL7
Area under the curve: 0.995

Figura 19

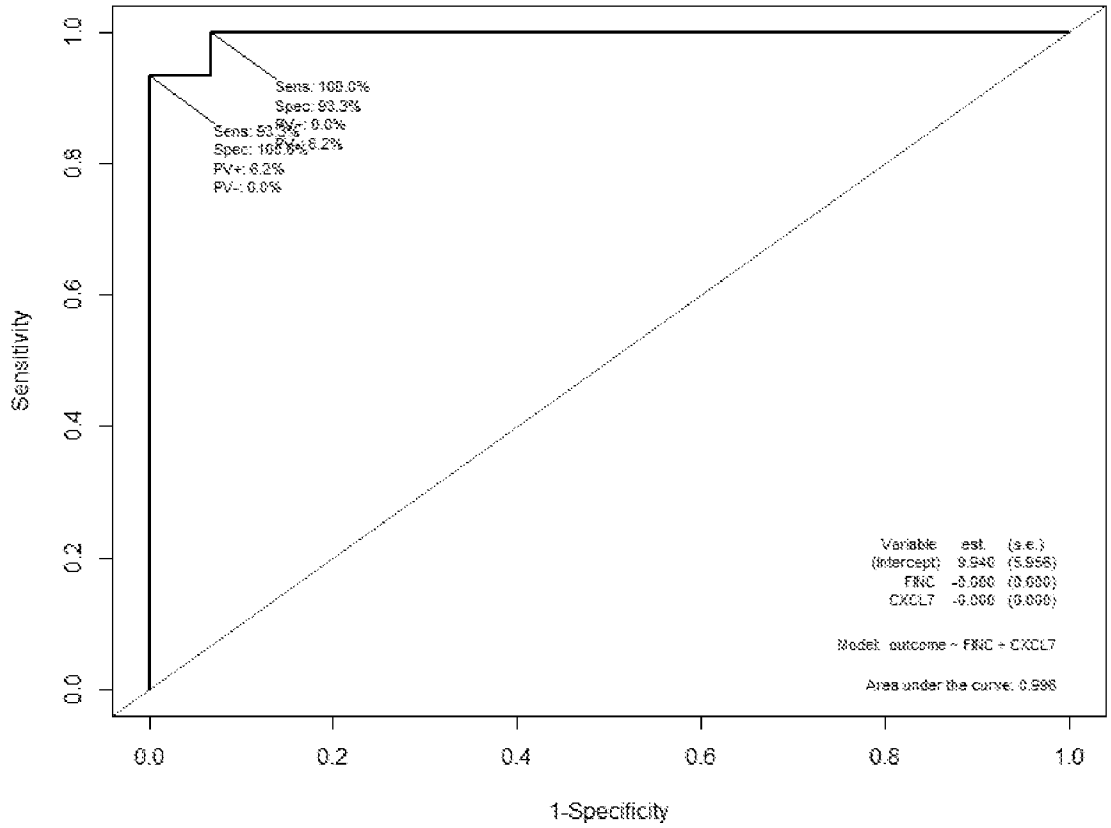

Sens: 100.0%
Spec: 93.3%
PV+: 6.2%
PV-: 0.0%
Sens: 93.3%
Spec: 100.0%
PV+: 6.2%
PV-: 0.0%
Variable est. (s.e.)
(Intercept) 9.940 (5.956)
FNC -0.000 (0.000)
CXCL7 -0.000 (0.000)
Model: outcome ~ FNC + CXCL7
Area under the curve: 0.998
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

Figura 20

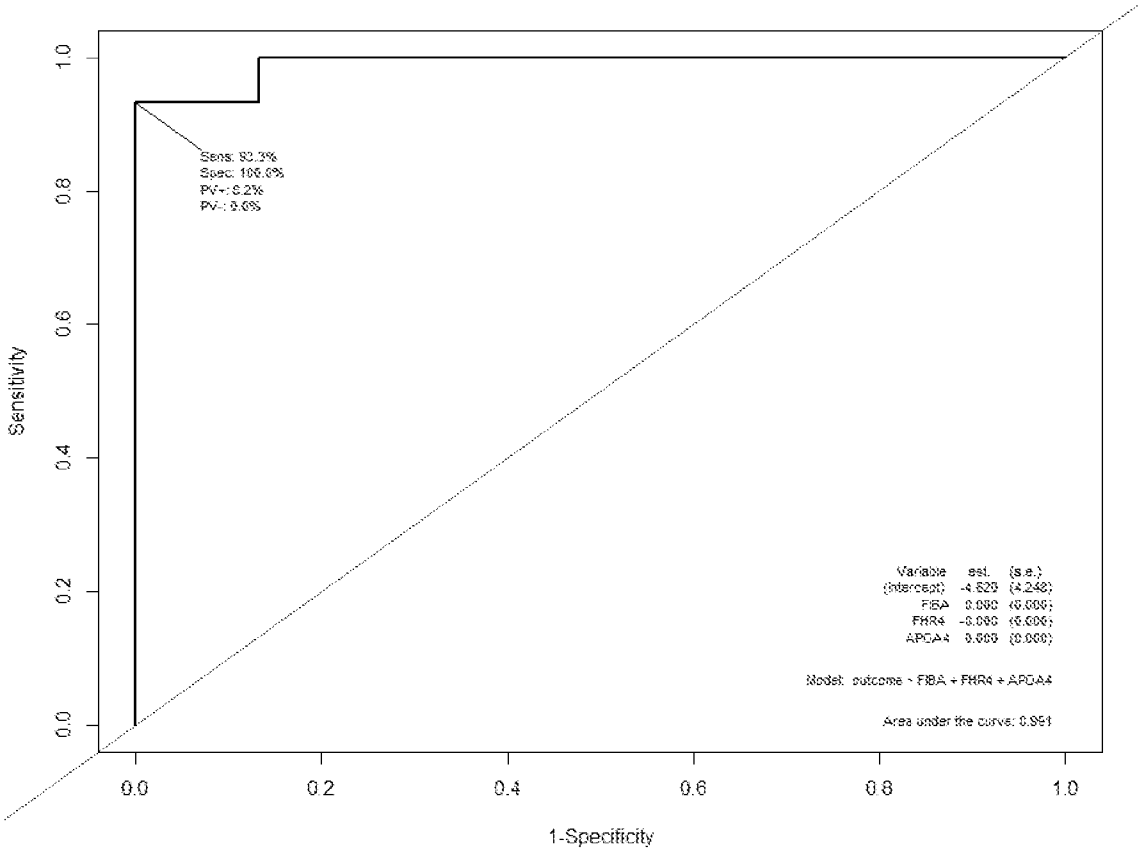

Sens: 93.3%
Spec: 100.0%
PV+: 6.2%
PV-: 0.6%
Variable est. (s.e.)
(intercept) -4.529 (4.248)
FIBA 0.000 (0.000)
FHR4 -0.000 (0.000)
APOA4 0.000 (0.000)
Model: outcome ~ FIBA + FHR4 + APOA4
Area under the curve: 0.951
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

Figura 21

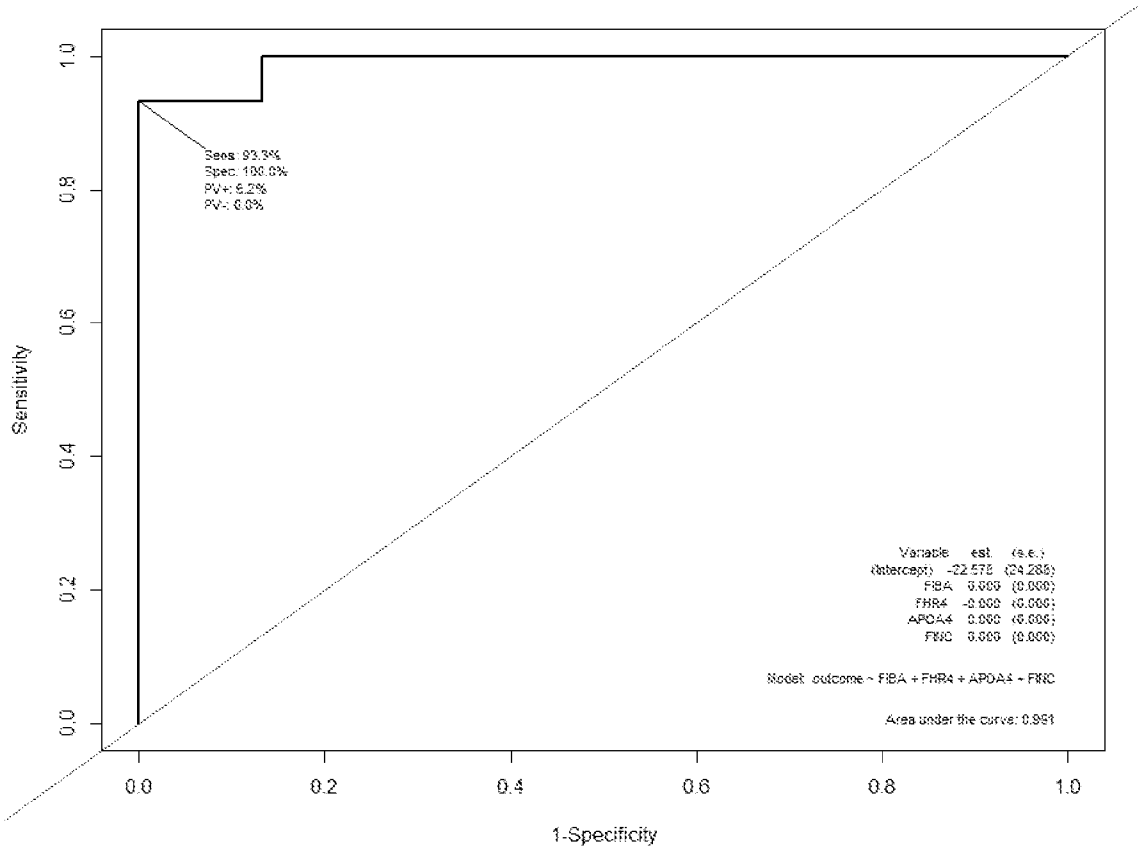

Sens: 93.3%
Spec: 100.0%
PV+: 6.2%
PV-: 0.0%
Variable est. (s.e.)
(Intercept) -22.575 (24.288)
FIBA 0.000 (0.000)
FHR4 -0.000 (0.000)
APOA4 0.000 (0.000)
FNC 0.000 (0.000)
Model: outcome ~ FIBA + FHR4 + APOA4 + FNC
Area under the curve: 0.991
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

Figura 22

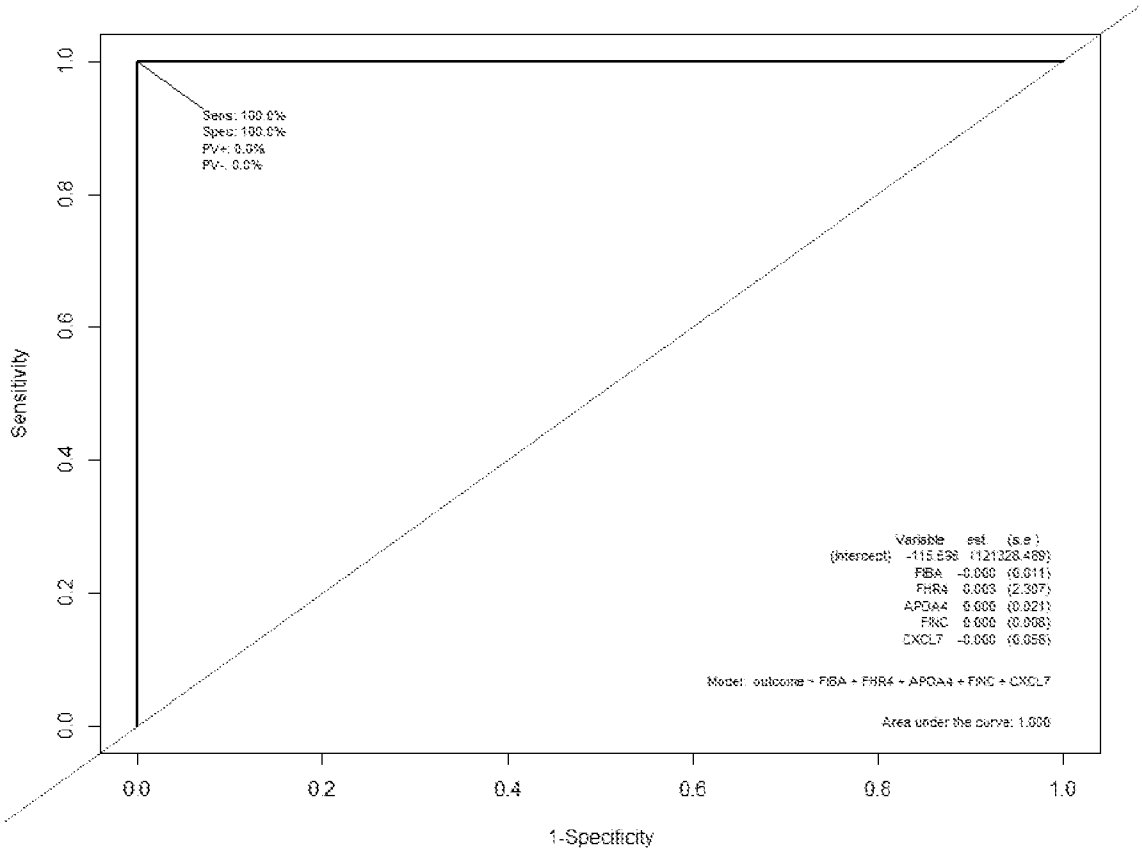

Sens: 100.0%
Spec: 100.0%
PV+: 0.0%
PV-: 0.0%
Variable est (s.e.)
(Intercept) -115.598 (121328.469)
FIBA -0.000 (0.011)
FHR4 0.003 (2.307)
APOA4 0.000 (0.021)
FINC 0.000 (0.008)
CXCL7 -0.000 (0.056)
Model: outcome ~ FIBA + FHR4 + APOA4 + FINC + CXCL7
Area under the curve: 1.000
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

Figura 23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2018/070139

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/68 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE/Elsevier, XPESP, y bases de datos TXT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	ORTEA IGNACIO et al. "Identification of candidate serum biomarkers of childhood-onset growth hormone deficiency using SWATH-MS and feature selection." Journal of Proteomics MAR 20 2018. 20/03/2018, Vol. 175, Pages 105-113, ISSN 1874-3919 (print) ISSN 1876-7737(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.jprot.2018.01.003> the whole document.	1, 3, 6, 9-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18/07/2018	**(23/07/2018)**
Name and mailing address of the ISA/ OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Facsimile No.: 91 349 53 04	Authorized officer M. García Coca Telephone No. 91 3493411

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2018/070139

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DURAN-ORTIZ SILVANA et al. "The impact of growth hormone on proteomic profiles: a review of mouse and adult human studies." Clinical proteomics England 2017. 30/11/2016, Vol. 14, Pages 24, ISSN 1542-6416 (Print), <DOI: doi:10.1186/s12014-017-9160-2 pubmed:28670222> (paragraphs "Proteomes in mouse strains with GH deficiency or GH excess", "The GHR-/- mouse plasma proteome" and "Serum proteome of patients with GHD" and tables 6 and 8)	1, 3, 6, 9-20
A	CHINOY A et al. "Diagnosis of growth hormone deficiency in the paediatric and transitional age." BAILLIERE' S BEST PRACTICE AND RESEARCH. CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, 20161104 BAILLIERE TINDALL, LONDON, GB. Kiess W; Sharma A, 04/11/2016, Vol. 30, Nº 6, Pages 737 - 747, ISSN 1521-690X, <DOI: doi:10.1016/j.beem.2016.11.002> (paragraphs "GH secretion profiles", "IGF-1 and IGFBP-1" and "Genomic evaluation")	1, 3, 6, 9-20
A	ANDERSSON B et al. "Protein profiling identified dissociations between growth hormone-mediated longitudinal growth and bone mineralization in short prepubertal children." Journal of Proteomics, 20110101 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL. Morrice Nicholas; Burchmore Richard, 01/01/2011, Vol. 74, Nº 1, Pages 89 - 100, ISSN 1874-3919 (abstract and tables 2-4)	1, 3, 6, 9-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2018/070139

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see extra sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2018/070139

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
G01N33/68 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE/Elsevier, XPESP, y bases de datos TXT

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
PX	ORTEA IGNACIO et al. "Identification of candidate serum biomarkers of childhood-onset growth hormone deficiency using SWATH-MS and feature selection." Journal of Proteomics MAR 20 2018. 20/03/2018, Vol. 175, Páginas 105-113, ISSN 1874-3919 (print) ISSN 1876-7737(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.jprot.2018.01.003> todo el documento.	1, 3, 6, 9-20

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
18/07/2018	**23 de julio de 2018 (23/07/2018)**
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Nº de fax: 91 349 53 04	Funcionario autorizado M. García Coca Nº de teléfono 91 3493411

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2018/070139

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	DURAN-ORTIZ SILVANA et al. "The impact of growth hormone on proteomic profiles: a review of mouse and adult human studies." Clinical proteomics England 2017. 30/11/2016, Vol. 14, Páginas 24, ISSN 1542-6416 (Print), <DOI: doi:10.1186/s12014-017-9160-2 pubmed:28670222> (apartados "Proteomes in mouse strains with GH deficiency or GH excess", "The GHR-/- mouse plasma proteome" y "Serum proteome of patients with GHD" y tablas 6 y 8)	1, 3, 6, 9-20
A	CHINOY A et al. "Diagnosis of growth hormone deficiency in the paediatric and transitional age." BAILLIERE' S BEST PRACTICE AND RESEARCH. CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, 20161104 BAILLIERE TINDALL, LONDON, GB. Kiess W; Sharma A, 04/11/2016, Vol. 30, Nº 6, Páginas 737 - 747, ISSN 1521-690X, <DOI: doi:10.1016/j.beem.2016.11.002> (apartados "GH secretion profiles", "IGF-1 and IGFBP-1" y "Genomic evaluation")	1, 3, 6, 9-20
A	ANDERSSON B et al. "Protein profiling identified dissociations between growth hormone-mediated longitudinal growth and bone mineralization in short prepubertal children." Journal of Proteomics, 20110101 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL. Morrice Nicholas; Burchmore Richard, 01/01/2011, Vol. 74, Nº 1, Páginas 89 - 100, ISSN 1874-3919 (resumen y tablas 2-4)	1, 3, 6, 9-20

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2018/070139

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones nºs:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. ☐ Las reivindicaciones nºs:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

3. ☐ Las reivindicaciones nºs:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

Ver Recuadro Suplementario

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.

3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones nºs:

4. ☒ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones **nºs: 1, 3, 6 y 9-20**

Indicación en cuanto a la protesta

☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

SUPLEMENTARIO DE REC. III **Observaciones cuando falta unidad de invención**

El objeto de la invención según las reivindicaciones 1-20 comprende más de una sola invención o grupo de invenciones no relacionadas entre sí, de manera que no integran un único concepto inventivo general único tal y como se exige en la Regla 13.1 PCT.

El problema técnico que subyace de la presente solicitud es la provisión de un método de diagnóstico y pronóstico del déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH.

Para la solución del problema propuesto, la reivindicación 1 define distintas alternativas, que son los distintos genes cuyos niveles de expresión son cuantificados en el método de diagnóstico propuesto. Estos genes no pueden ser agrupados en una misma clase de compuestos. Para que los genes o las proteínas codificadas por ellos sean consideradas como pertenecientes a una misma clase de compuestos, estos deben de compartir una misma estructura, que hagan que su función sea, si no idéntica, sí similar. Esta condición no se cumple con los genes propuestos puesto que no comparten una misma estructura ni una misma función pues pertenecen a familias de genes/proteínas distintas.

Por lo tanto, como no hay un concepto general único, tal y como se exige en la Regla 13.1 PCT, y como tampoco se encuentran otras características que puedan considerarse como elementos técnicos particulares en el sentido de la Regla 13.2 PCT, la presente solicitud internacional de patente comprende más de una invención o grupo de invenciones relacionadas entre sí.

Así, habría 8 invenciones, una por cada marcador utilizado en el método de diagnóstico y pronóstico del déficit de GH y/o de una enfermedad asociada al déficit de GH.

Invención 1: las reivindicaciones relacionadas con el biomarcador FIBA

Invención 2: las reivindicaciones relacionadas con el biomarcador FHR4

Invención 3: las reivindicaciones relacionadas con el biomarcador APOA4

Invención 4: las reivindicaciones relacionadas con el biomarcador FINC

Invención 5: las reivindicaciones relacionadas con el biomarcador CXCL7

Invención 6: las reivindicaciones relacionadas con el biomarcador F13A

Invención 7: las reivindicaciones relacionadas con el biomarcador SAA2

Invención 8: las reivindicaciones relacionadas con el biomarcador APOC4